

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA BORA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE REATORES DE ENZIMAS  
IMOBILIZADAS**

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA BORA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE REATORES DE ENZIMAS  
IMOBILIZADAS**

Tese apresentada à Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
Co-orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

CURITIBA

2013

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais  
Hamilton e Cida, ao meu esposo Antonio  
Otávio, à minha irmã Kamila e aos meus  
avós Landa, Lúcia e Pedro

## **AGRADECIMENTOS**

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus amáveis pais Hamilton e Cida, que no decorrer da minha vida me proporcionaram, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus a força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer sempre a eles minha imensa gratidão e amor.

À Deus, dedico o meu agradecimento maior, por sempre abençoar minha vida.

Ao meu marido, Antonio Otávio, agradeço pelo eterno apoio, amor e carinho, pela parceria fundamental em minha vida, pelos momentos felizes e por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis.

À minha irmã e amiga, Kamila, agradeço por ser uma companheira indispensável, pelo carinho e compreensão, e pelos momentos imparciais de felicidade.

Agradeço à toda a minha família e amigos por estarem sempre ao meu lado, acreditando e me motivando a seguir em frente, e me proporcionando uma vida mais prazerosa.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, agradeço pela intensa dedicação a este trabalho, pelos ensinamentos, por todos os anos de trabalho juntos, e por ter incentivado-me a seguir carreira na ciência.

Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana, pela ajuda substancial ao trabalho e pela disposição e motivação de sempre colaborar da melhor forma.

Ao Dr. Carston R. Wagner, agradeço por ter me recebido na University of Minnesota, e com isso permitir a expansão de meu conhecimento, e meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todos os demais professores que colaboraram de qualquer forma à minha formação, em especial ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Almeriane Weffort Santos, e ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga.

À minha grande amiga e colega de trabalho Keylla, agradeço por ser meu braço direito, sempre disposta a me ajudar, e por todos os momentos juntas, felizes e difíceis, obrigada pela forma carinhosa como sempre esteve ao meu lado.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, dentre eles Leopoldo, Asad, Cláudia, Adélia, Marcela, Thiago, Sidath, Matthew, Kari, Amit, Rachit, Jing Jing, Jing Liu, Jae Chul, Aniekan, Adrian, Peter e Katelyn, agradeço por toda a ajuda, pelas palavras de incentivo, e pelas discussões científicas e não-científicas que tornaram o nosso trabalho mais agradável.

Agradeço também aos demais professores e colegas do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, a Capes e a Universidade Federal do Paraná.

## EPÍGRAFE

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”.

*Winston Churchill*

## RESUMO

Enzimas são catalisadores de reações orgânicas capazes de converter um substrato num produto com elevada seletividade e especificidade. Reatores de enzimas imobilizadas consistem de uma enzima imobilizada em um suporte adequado, tornando-se um catalisador confinado em uma matriz, capaz de ser usado repetidamente pelo tempo que permanecer ativo. Acoplados a cromatografia líquida, os reatores enzimáticos podem ser usados para uma gama de aplicações, como na triagem de inibidores enzimáticos, na biocatálise *on-line* ou na detecção e purificação de analitos e metabólitos. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver reatores de tirosinase e de di-hidrofolato redutase imobilizadas para aplicação na triagem de inibidores enzimáticos e na purificação de moléculas, respectivamente. *Agaricus bisporus* foi usado como fonte de tirosinase, e as condições para extração da enzima foram otimizadas por planejamento fatorial de experimentos. A enzima foi então imobilizada por ambas as técnicas *in situ* e *in batch* em epoxisílica sintetizada por refluxo ou por micro-ondas, e os reatores desenvolvidos foram comparados com relação a quantidade de enzima e de atividade retida durante a imobilização, e quanto a atividade enzimática, cinética e estabilidade da enzima imobilizada. O reator desenvolvido pela técnica *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas apresentou os melhores resultados, e a sensibilidade do mesmo aos solventes metanol, acetonitrila e dimetilsulfóxido foi primeiramente testada. O reator foi então validado na presença de um inibidor padrão, o ácido kójico, e o mecanismo de inibição competitivo desta substância contra a enzima imobilizada foi determinado. Finalmente, substâncias de diversas classes químicas, inclusive derivados inéditos obtidos por biotransformação e síntese química, foram testadas quanto aos seus potenciais de inibição. O reator de tirosinase foi eficiente na caracterização de inibidores da tirosinase com potencial para serem usados no tratamento de patologias associadas a hiperpigmentação. Para o desenvolvimento de reator de di-hidrofolato redutase imobilizada, a forma monomérica da enzima e duas formas diméricas foram expressadas e purificadas de culturas de *Escherichia coli*. As enzimas foram então imobilizadas pela técnica *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas, e os reatores obtidos foram comparados com relação a quantidade de enzima e de atividade retida durante a imobilização, e quanto a atividade e estabilidade da enzima imobilizada. O dímero com resíduo de cisteína terminal apresentou os melhores resultados de imobilização, sendo o reator desta forma enzimática usado para estudo do potencial de aplicação na purificação de moléculas marcadas. Para tanto, metotrexato e ligante de bis-metotrexato foram avaliados quanto a capacidade de se ligarem fortemente e depois se desligarem de maneira controlada em condições brandas da coluna enzimática, podendo funcionar como marcadores de macromoléculas a serem purificadas. Desta forma, provou-se o potencial do reator de di-hidrofolato redutase de ser aplicado de forma eficiente para a retenção e purificação de macromoléculas de interesse marcadas com metotrexato ou ligante de bis-metotrexato.

Palavras-chave: *Agaricus bisporus*, di-hidrofolato redutase, epoxisílica, imobilização, tirosinase.

## ABSTRACT

Enzymes are catalysts of organic reactions able to convert a substrate into a product with high selectivity and specificity. Immobilized enzyme reactors consist of an enzyme immobilized in a suitable support, becoming a catalyst confined in a matrix able to be used repeatedly as long as it remains active. Coupled with liquid chromatography, those reactors can be used for a wide range of applications such as in the screening of enzyme inhibitors, in the on-line biosynthesis or in the detection and purification of analites and metabolites. This work aimed to develop tyrosinase and dihydrofolate reductase immobilized reactors to be applied in the screening of enzyme inhibitors and in the purification of molecules, respectively. *Agaricus bisporus* was used as a source of tyrosinase, and the conditions for enzyme extraction were optimized by factorial design of experiments. The enzyme was then immobilized by both *in situ* and *in batch* techniques in epoxysilica synthesized by reflux or by microwave, and the developed reactors were compared in terms of enzyme and activity retained during the immobilization process, and regarding the activity, kinetics and stability of the immobilized enzyme. The reactor developed by the *in situ* technique in epoxysilica synthesized by microwave presented the best outcomes, and the sensitivity of this reactor to methanol, acetonitrile and dimethyl sulfoxide was first tested. The reactor was then validated in the presence of a standard inhibitor, kojic acid, and the competitive inhibition mechanism of this substance against the immobilized enzyme was determined. Finally, several substances from different chemical classes, including novel derivatives obtained by biotransformation and chemical synthesis, were tested for their inhibitory potential. The tyrosinase reactor was an efficient method to the characterization of enzyme inhibitors with potential to be used in the treatment of pathologies associated with hyperpigmentation. To develop immobilized dihydrofolate reductase reactors, the monomeric form of the enzyme and two dimeric forms were expressed and purified from *Escherichia coli* cultures. The enzymes were then immobilized by the *in situ* technique in epoxysilica synthesized by microwave, and the reactors were compared in terms of enzyme and activity retained during the immobilization, and about the activity and stability of the immobilized enzyme. The dimeric enzyme containing a terminal cysteine presented the best immobilization outcomes and its reactor was thereby used to study the potential application of the technique in the purification of labeled macromolecules. For this purpose, methotrexate and bis-methotrexate trilinker were assessed for their ability to strongly bind and then release in a controlled manner under mild conditions from the enzymatic reactor, being able to act as markers of macromolecules to be purified. Therefore, it was proved the potential of immobilized dihydrofolate reductase reactors to be applied efficiently to the retention and purification of interest macromolecules labeled with methotrexate or bis- methotrexate trilinker.

Keywords: *Agaricus bisporus*, dihydrofolate reductase, epoxysilica, immobilization, tyrosinase.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA.....	21
FIGURA 2 – APLICAÇÃO DE IMER NA TRIAGEM DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS COM DETECÇÃO DA FORMAÇÃO DO PRODUTO.....	26
FIGURA 3 – COGUMELO <i>Agaricus bisporus</i> .....	29
FIGURA 4 – SÍTIO ATIVO DA TIROSINASE NA FORMA ATIVA E <sub>ox</sub> .....	30
FIGURA 5 - FORMAS E <sub>M</sub> (A), E <sub>D</sub> (B) E E <sub>ox</sub> (C) DA TIROSINASE .....	30
FIGURA 6 – HIDROXILAÇÃO E OXIDAÇÃO DE UM MONOFENOL À QUINONA CORRESPONDENTE PELA TIROSINASE .....	31
FIGURA 7 - BIOSÍNTESE DA MELANINA .....	33
FIGURA 8 – ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO PARCIAL DA TIROSINASE DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	44
FIGURA 9 - CURVAS CINÉTICAS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA ENVOLVENDO TIROSINASE E SEU SUBSTRATO L-DOPA, COM FORMAÇÃO DE DOPACROMO (A); PORÇÕES LINEARES (FASE LOG) DAS CURVAS CINÉTICAS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA (B)...	53
FIGURA 10 – CURVA ANALÍTICA DE DOPACROMO .....	53
FIGURA 11 – ESPECTRO UV DE DOPACROMO SINTETIZADO A PARTIR DA OXIDAÇÃO COMPLETA DE L-DOPA POR PERIODATO DE SÓDIO .....	54
FIGURA 12 - CURVA PADRÃO DE BSA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BIURETO .....	54
FIGURA 13 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> (PA) E DE EXTRATO LIOFILIZADO (EL) DE <i>Agaricus bisporus</i> DURANTE 60 DIAS.....	55
FIGURA 14 – GRÁFICO DE EFEITOS NORMAIS – FATORES QUE INFLUENCIAM NA EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	57
FIGURA 15 – GRÁFICO DE INTERAÇÕES ENTRE OS FATORES AVALIADOS NA EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	57
FIGURA 16 – GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS – INFLUÊNCIA DOS FATORES INDIVIDUAIS NA EXTRAÇÃO DA TIROSINASE DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> .....	58
FIGURA 17 – MAPA DE CONTOURNO TEMPO (MIN) (A) <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO (mM) (B)–OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> 59	59
FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NOS PRECIPITADOS (Ppt) E NOS SOBRENADANTES (Sob) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE SULFATO DE AMÔNIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO INICIAL (EI).....	60
FIGURA 19 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DOS PRECIPITADOS (Ppt) E DOS SOBRENADANTES (Sob) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE SULFATO DE AMÔNIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO INICIAL (EI).....	60
FIGURA 20 – CORRELAÇÃO ENTRE TEOR DE PROTEÍNA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DOS PRECIPITADOS (Ppt) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE SULFATO DE AMÔNIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO INICIAL .....	61
FIGURA 21 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE UMA SOLUÇÃO DE TIROSINASE IMPURA (SE) NA PRESENÇA DE DTE, EDTA, EGTA E H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	63
FIGURA 22 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE UMA SOLUÇÃO DE TIROSINASE ENRIQUECIDA (ST) NA PRESENÇA DE DTE, EDTA, EGTA E H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	63
FIGURA 23 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE UMA SOLUÇÃO DE TIROSINASE ENRIQUECIDA (ST) NA PRESENÇA DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
FIGURA 24 – ESQUEMA DA EPOXIDAÇÃO DA SÍLICA A PARTIR DE SUA REAÇÃO COM (3- GLICIDILOXIPROPIL)TRIMETOXISILANO (A); E DA REAÇÃO DA EPOXISÍLICA COM A TIROSINASE (B) .....	66

FIGURA 25 – PROTEÍNA RETIDA DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE EM EPOXISÍLICA .....	67
FIGURA 26 – CURVA PADRÃO DE BSA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WADDELL .....	67
FIGURA 27 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) RETIDA DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE.....	69
FIGURA 28 - CROMATOGRAMA APRESENTANDO O PICO DE DOPACROMO OBTIDO APÓS INJEÇÃO DE L-DOPA NO REATOR DE TIROSINASE .....	70
FIGURA 29 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DOPACROMO.....	70
FIGURA 30 – GRÁFICO MICHAELIS-MENTEN DA TIROSINASE IMOBILIZADA (A) E LIVRE (B)...	71
FIGURA 31 – PARÂMETROS CINÉTICOS $K_m$ E $V_{max}$ PARA A TIROSINASE LIVRE E IMOBILIZADA EM EPOXISÍLICA.....	72
FIGURA 32 - ESTABILIDADE DOS IMER ARMAZENADOS A 4 °C EM TAMPÃO FOSFATO 15 mM pH 7,0 CONTENDO 0,01% DE AZIDA SÓDICA .....	74
FIGURA 33 - INFLUÊNCIA DE METANOL (A), ACETONITRILA (B) E DIMETILSULFÓXIDO (C) NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DA TIROSINASE IMOBILIZADA .....	77
FIGURA 34 – CROMATOGRAMA APRESENTANDO PICOS DE DOPACROMO SOBREPOSTOS APÓS INJEÇÃO DE L-DOPA 10 mM (A) NA PRESENÇA DE ÁCIDO KÓJICO 1,0 (B) E 5,0 mM (C) .....	80
FIGURA 35 – INIBIÇÃO DA TIROSINASE IMOBILIZADA PELO ÁCIDO KÓJICO .....	80
FIGURA 36 – CURVA DE MICHAELIS-MENTEN PARA A TIROSINASE IMOBILIZADA EM EPOXISÍLICA, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ÁCIDO KÓJICO (AK) 3 mM.....	81
FIGURA 37 – GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK PARA A TIROSINASE IMOBILIZADA EM EPOXISÍLICA, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ÁCIDO KÓJICO (AK) 3 mM.....	81
FIGURA 38 – ATIVIDADE DO IMER DE TIROSINASE NA PRESENÇA DE INIBIDORES TESTE ....	85
FIGURA 39 – INIBIÇÃO DA TIROSINASE IMOBILIZADA PELO DFQ1 .....	87
FIGURA 40 – ATIVIDADE DA TIROSINASE LIVRE NA PRESENÇA DE DFQ1, DAB1 E DAB2 .....	88
FIGURA 41 – MOLÉCULA DA DI-HIDROFOLATO REDUTASE, COM DI-HIDROFOLATO (VERDE) LIGADO AO SEU SÍTIO ATIVO, AO LADO DO NADPH (AMARELO) .....	90
FIGURA 42 – REDUÇÃO DO 7,8-DI-HIDROFOLATO A 5,6,7,8-TETRA-HIDROFOLATO PELA DI-HIDROFOLATO REDUTASE .....	91
FIGURA 43 – ESQUEMA REPRESENTANDO A FORMA MONOMÉRICA (A), DIMÉRICA MUTANTE (B) E DIMÉRICA MUTANTE COM RESÍDUO DE CISTEÍNA TERMINAL (C) DA DHFR .....	95
FIGURA 44 – CURVAS CINÉTICAS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA ENVOLVENDO AS FRAÇÕES 1, 3 E 6 ELUÍDAS DA COLUNA DE METOTREXATO DURANTE PURIFICAÇÃO DA DHFR <sup>2</sup> , NA PRESENÇA DE NADPH E DHF.....	104
FIGURA 45 – ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE DEAE-CELULOSE DURANTE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR <sup>2</sup> .....	105
FIGURA 46 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE DEAE-CELULOSE DURANTE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR <sup>2</sup> ....	106
FIGURA 47 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DE FRAÇÕES DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR .....	106
FIGURA 48 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DE FRAÇÕES DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR <sup>2</sup> .....	107
FIGURA 49 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DE FRAÇÕES DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> .....	107
FIGURA 50 - PROTEÍNA IMOBILIZADA DURANTE (A) E APÓS 4 HORAS (B) DE RECIRCULAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA PELA COLUNA DE EPOXISÍLICA .....	108
FIGURA 51 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA RETIDA DURANTE (A) E APÓS 4 HORAS (B) DE RECIRCULAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA PELA COLUNA DE EPOXISÍLICA .	109

FIGURA 52 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS INJEÇÃO DE NADPH NA AUSÊNCIA (A) E NA PRESENÇA (B) DE DHF NO REATOR DE DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> IMOBILIZADA .....	110
FIGURA 53 – ESPECTRO UV DO NADPH .....	111
FIGURA 54 – ATIVIDADE CATALÍTICA DOS REATORES DE ENZIMA IMOBILIZADA .....	111
FIGURA 55 – ESQUEMA APRESENTANDO AS DIFERENÇAS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS DHFR (A), DHFR <sup>2</sup> (B) E DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> (C) E AS POSSIBILIDADES DE IMOBILIZAÇÃO DAS MESMAS EM EPOXISÍLICA .....	113
FIGURA 56 – ESTABILIDADE DOS IMER (A) E DAS ENZIMAS LIVRES (B) ARMAZENADAS A 4 °C EM TAMPÃO FOSFATO 10 mM pH 7,0 CONTENDO 0,01% (m/v) DE AZIDA SÓDICA .....	114
FIGURA 57 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DE NANOESTRUTURAS MONOMÉRICAS (ACIMA) E MULTIMÉRICAS (ABAIXO) FUNCIONALIZADAS COM OLIGONUCLEOTÍDEO .....	116
FIGURA 58 – REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA COLUNA DE DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> DURANTE INJEÇÕES DE BIS-MTX .....	117
FIGURA 59 – ABSORÇÃO DA TRIMETOPRIMA 2 µM A 302 NM (A). ELUIÇÃO DE MTX (B) E DE BIS-MTX (C) DA COLUNA DE DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> , OBSERVADA A 302 NM .....	118
FIGURA 60 – ESPECTRO UV DA TRIMETOPRIMA (A) E DO METOTREXATO (B) .....	119
FIGURA 61 – ESQUEMA REPRESENTANDO A PURIFICAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS MARCADAS COM METOTREXATO (MTX) PELO REATOR DE DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> IMOBILIZADA .....	120

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FATORES E RESPECTIVOS NÍVEIS AVALIADOS NA ETAPA DE TRIAGEM DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA A EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> APÓS EXTRAÇÃO COM ACETONA .....	41
TABELA 2 – FATORES E RESPECTIVOS NÍVEIS AVALIADOS NA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA A EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE <i>Agaricus bisporus</i> APÓS EXTRAÇÃO COM ACETONA .....	42
TABELA 3 – TABELA DE PURIFICAÇÃO PARA A ETAPA DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE <i>Agaricus bisporus</i> COM SULFATO DE AMÔNIO .....	61
TABELA 4 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE EM EPOXISÍLICA POR DIFERENTES MÉTODOS .....	75
TABELA 5 – SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO AVALIADO NO REATOR DE TIROSINASE, SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, CLASSES QUÍMICAS, CONCENTRAÇÕES TESTADAS E PORCENTAGEN DE INIBIÇÃO ENCONTRADA ...	83

## LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

ESTRUTURA QUÍMICA I – ÁCIDO KÓJICO.....	35
ESTRUTURA QUÍMICA II – ÁCIDO GÁLICO.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA III – ÁCIDO <i>p</i> -COUMÁRICO.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA IV – ÁCIDO ASCÓRBICO.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA V – ÁCIDO QUÍNICO.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA VI – NARINGENINA.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA VII – 2-FENILQUINOLINA.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA VIII – ESTEVIOL.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA IX – ÁCIDO BETULÍNICO.....	84
ESTRUTURA QUÍMICA X – METOTREXATO.....	92
ESTRUTURA QUÍMICA XI – TRIMETOPRIMA.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE	Atividade enzimática
Bis-MTX	Ligante de bis-metotrexato
BR	Reator de tirosinase imobilizada obtido pela técnica de imobilização <i>in batch</i> em epoxisílica sintetizada por refluxo
BSA	Albumina de soro bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
CI <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAB1/ DAB2	Derivados do ácido betulínico
DAD	Detector de arranjo de diodos
DEAE	Dietilaminoetil
DFQ1/ DFQ2	Derivados da 2-fenilquinolina
DHF	Di-hidrofolato
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
EI	Extrato enzimático inicial
EL	Extrato liofilizado de <i>Agaricus bisporus</i>
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
GPTMS	(3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano
IMER	Reator de enzima imobilizada ( <i>immobilized enzyme reactor</i> )
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido
K <sub>m</sub>	Concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima da reação enzimática
LB	Caldo de lisogenia ( <i>Lysogeny Broth</i> )
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina
MTEN	Tampão contendo MES (ácido 2-( <i>N</i> -morfolino)etanosulfônico), Tris, etanolamina e NaCl
MTX	Metotrexato
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato, oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato, reduzida

PA	Pó de <i>Agaricus bisporus</i> após extração com acetona
Ppt	Precipitado
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SE	Solução enzimática impura
SM	Reator de tirosinase imobilizada obtido pela técnica de imobilização <i>in situ</i> em epoxisílica sintetizada por micro-ondas
Sob	Sobrenadante
SR	Reator de tirosinase imobilizada obtido pela técnica de imobilização <i>in situ</i> em epoxisílica sintetizada por refluxo
ST	Solução de tirosinase purificada
THF	Tetra-hidrofolato
TMP	Trimetoprima
UV	Ultravioleta
$V_{\max}$	Velocidade máxima da reação enzimática

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA E REATORES DE ENZIMA IMOBILIZADA .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Aplicações das enzimas imobilizadas .....	24
3.2.2 Técnicas de imobilização enzimática .....	27
<b>4 REATORES DE TIROSINASE IMOBILIZADA.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
4.1.1 Tirosinase .....	29
4.1.2 Tirosinase na melanogênese .....	32
4.1.3 Inibidores da tirosinase .....	33
4.1.4 Imobilização da tirosinase .....	36
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.2.1 Materiais .....	38
4.2.2 Teste de atividade de tirosinase no <i>Agaricus bisporus</i> comercial .....	39
4.2.3 Purificação parcial da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> .....	39
4.2.3.1 Pó após extração com acetona <i>versus</i> extrato liofilizado .....	39
4.2.3.2 Otimização da extração de tirosinase do PA.....	41
4.2.3.3 Precipitação da tirosinase com sulfato de amônio .....	42
4.2.3.4 Método estabelecido para purificação parcial da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	43
4.2.4 Atividade enzimática na presença de DTE, EDTA, EGTA E H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	44
4.2.5 Cinética da enzima livre .....	45
4.2.6 Desenvolvimento dos reatores de tirosinase imobilizada .....	45
4.2.6.1 Síntese da epoxisílica por refluxo .....	46
4.2.6.2 Síntese da epoxisílica por micro-ondas .....	46
4.2.6.3 Empacotamento das colunas cromatográficas.....	46
4.2.6.4 Imobilização antes do empacotamento – método <i>in batch</i> .....	47
4.2.6.5 Imobilização após o empacotamento – método <i>in situ</i> .....	47



4.2.6.6	Proteína e atividade enzimática removida pela imobilização enzimática.....	47
4.2.6.7	Atividade e cinética dos reatores enzimáticos.....	48
4.2.6.8	Estabilidade dos reatores de tirosinase imobilizada.....	49
4.2.7	Aplicação do reator de tirosinase imobilizada.....	49
4.2.7.1	Sensibilidade do reator enzimático a solventes orgânicos .....	49
4.2.7.2	Teste do reator de tirosinase imobilizada com inibidor padrão.....	50
4.2.7.3	Aplicação do reator de tirosinase imobilizada para triagem de inibidores enzimáticos .....	50
4.2.7.4	Comparação dos resultados obtidos com o método padrão .....	51
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
4.3.1	Teste de atividade de tirosinase no <i>Agaricus bisporus</i> comercial .....	52
4.3.2	Purificação parcial da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> .....	52
4.3.2.1	Pó após extração com acetona <i>versus</i> extrato liofilizado .....	53
4.3.2.2	Otimização da extração de tirosinase do PA.....	56
4.3.2.3	Precipitação da tirosinase com sulfato de amônio .....	59
4.3.3	Atividade enzimática na presença de DTE, EDTA, EGTA E H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	62
4.3.4	Desenvolvimento dos reatores de tirosinase imobilizada .....	65
4.3.4.1	Proteína removida pela imobilização enzimática .....	66
4.3.4.2	Atividade enzimática removida pela imobilização enzimática .....	68
4.3.4.3	Atividade e cinética dos reatores enzimáticos.....	69
4.3.4.4	Estabilidade dos reatores de tirosinase imobilizada.....	73
4.3.4.5	Comparação dos métodos de imobilização da tirosinase em epoxisílica .....	74
4.3.5	Aplicação do reator de tirosinase imobilizada.....	75
4.3.5.1	Sensibilidade do reator enzimático a solventes orgânicos .....	76
4.3.5.2	Teste do reator de tirosinase imobilizada com inibidor padrão.....	79
4.3.5.3	Aplicação do reator de tirosinase imobilizada para triagem de inibidores enzimáticos .....	82
<b>5</b>	<b>REATORES DE DI-HIDROFOLATO REDUTASE IMOBILIZADA .....</b>	<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>89</b>
5.1.1	Di-hidrofolato redutase .....	89
5.1.2	Imobilização da DHFR .....	93
<b>5.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>94</b>
5.2.1	Materiais .....	94
5.2.2	Obtenção das enzimas DHFR, DHFR <sup>2</sup> e DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> .....	94
5.2.2.1	Transformação dos plasmídeos em células de <i>E. coli</i> .....	95
5.2.2.2	Preparação e purificação das enzimas a partir de culturas de <i>E. coli</i> .....	96

5.2.2.3	Análise das proteínas purificadas .....	97
5.2.3	Síntese do ácido di-hidrofílico .....	98
5.2.4	Método para determinação da atividade da DHFR livre .....	99
5.2.5	Estabilidade da enzima livre.....	99
5.2.6	Desenvolvimento dos reatores de DHFR, DHFR <sup>2</sup> e DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> imobilizada .....	100
5.2.6.1	Síntese da epoxisílica por micro-ondas .....	100
5.2.6.2	Empacotamento das colunas cromatográficas.....	100
5.2.6.3	Imobilização enzimática <i>in situ</i> .....	101
5.2.6.4	Proteína e atividade enzimática removida pela imobilização enzimática.....	101
5.2.6.5	Atividade e estabilidade dos reatores enzimáticos.....	101
5.2.7	Aplicação do reator de DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> imobilizada.....	102
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
5.3.1	Obtenção das enzimas DHFR, DHFR <sup>2</sup> e DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> .....	103
5.3.2	Desenvolvimento dos reatores de DHFR, DHFR <sup>2</sup> e DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> imobilizada .....	107
5.3.2.1	Proteína e atividade enzimática removida pela imobilização enzimática.....	108
5.3.2.2	Atividade e estabilidade dos reatores enzimáticos.....	109
5.3.3	Aplicação do reator de DHFR <sup>2</sup> <sub>Cys</sub> imobilizada.....	114
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>122</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de reações usados em diversas áreas de interesse por serem biocompatíveis, biodegradáveis e derivados de fontes renováveis. A tecnologia enzimática é amplamente explorada na área da saúde, já que enzimas são alvos atrativos da terapia medicamentosa por seus papéis fundamentais em processos metabólicos e em fisiopatologias. Na biotecnologia as enzimas são aplicadas principalmente para a biocatálise de substâncias orgânicas, e na área ambiental e farmacêutica para a detecção e purificação de analitos e metabólitos. O uso de reatores de enzimas imobilizadas tem sido apontado como método alternativo e vantajoso para estas aplicações, reduzindo o tempo de análise, tornando o processo enzimático *on-line* e fornecendo a possibilidade de reutilização da enzima. Esse sistema conectado a CLAE consiste de uma coluna cromatográfica a cuja fase estacionária uma enzima de interesse é imobilizada, acoplada entre o injetor e o detector de um cromatógrafo líquido.

Reatores de enzima imobilizada são ferramentas eficientes para a triagem de inibidores enzimáticos, e uma das enzimas potencialmente úteis para imobilização e triagem de inibidores é a tirosinase. Esta está envolvida na biossíntese de melanina, catalizando duas etapas importantes da reação, sendo que a sua inibição pode ser explorada no tratamento de patologias associadas a hiperpigmentação da pele. Por isso, existe grande interesse na procura de substâncias inibidoras desta enzima com potencial terapêutico, e a técnica de imobilização enzimática pode ser usada para esta finalidade.

Outra aplicação importante dos reatores de enzima imobilizada acoplados a CLAE é a purificação de analitos, funcionando como um método de cromatografia por bioafinidade como o complexo (estrepto) avidina-biotina. Uma enzima de interesse para esta finalidade é a di-hidrofolato redutase (DHFR), que é essencial para o metabolismo normal dos folatos e para a síntese de DNA, sendo reconhecida como um alvo na terapia anticâncer e antibacterina. Ligantes fortes desta enzima, como o metotrexato (MTX), podem ser usados como marcadores de moléculas de interesse, e o reator de DHFR imobilizada pode atuar na seleção e purificação destas espécies marcadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver reatores de tirosinase e de di-hidrofolato redutase imobilizadas para aplicação em diferentes áreas de interesse.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a enzima tirosinase de *Agaricus bisporus* e determinar seus parâmetros de atividade;
- Testar a imobilização da enzima em epoxisílica por diversas técnicas;
- Caracterizar os reatores enzimáticos com relação a capacidade de imobilização proteica, cinética, atividade e estabilidade;
- Selecionar as melhores condições de imobilização;
- Testar o reator de tirosinase como método para triagem de inibidores enzimáticos, utilizando inibidores padrões e substâncias com potencial inibidor;
- Purificar a forma monomérica e duas formas diméricas da enzima di-hidrofolato redutase a partir de culturas de *Escherichia coli*;
- Imobilizar as enzimas em epoxisílica;
- Caracterizar os reatores enzimáticos com relação a capacidade de imobilização proteica, atividade e estabilidade;
- Determinar a melhor forma enzimática a ser imobilizada;
- Testar o reator de di-hidrofolato redutase como método potencial para purificação de macromoléculas marcadas com metotrexato ou ligante de bis-metotrexato.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ENZIMAS E SUAS APLICAÇÕES

Enzimas são agentes catalíticos capazes de converter um substrato num produto com elevada seletividade e especificidade, o que lhes permite realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais. Uma função fundamental das enzimas é aumentar a velocidade de reações químicas sem serem consumidas ou alteradas permanentemente pela reação. A atividade catalítica das enzimas envolve a ligação de seus sítios ativos aos substratos, formando o complexo enzima-substrato. Num segundo momento ocorre conversão do substrato ao produto, com formação do complexo enzima-produto e posterior liberação do produto no meio, tornando a enzima livre para catalisar uma nova reação (Figura 1). A ligação do substrato ao sítio ativo enzimático é uma interação bastante específica, e geralmente é do tipo não covalente, ocorrendo por ligações de hidrogênio, iônicas ou hidrofóbicas. A maioria das reações bioquímicas envolve interação de dois ou mais substratos diferentes com a enzima, e podem exigir a presença de cofatores. Estes, classificados como coenzimas ou grupos prostéticos, exercem função importante no processo catalítico enzimático, trabalhando juntamente com a enzima para aumentar a velocidade da reação. Coenzimas, como o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato, reduzida) por exemplo, servem como carreadores de diversos tipos de grupos químicos ou elétrons, os quais são transferidos para a molécula de substrato pela enzima durante a reação (Cooper, 2000; Lehninger et al., 2007).

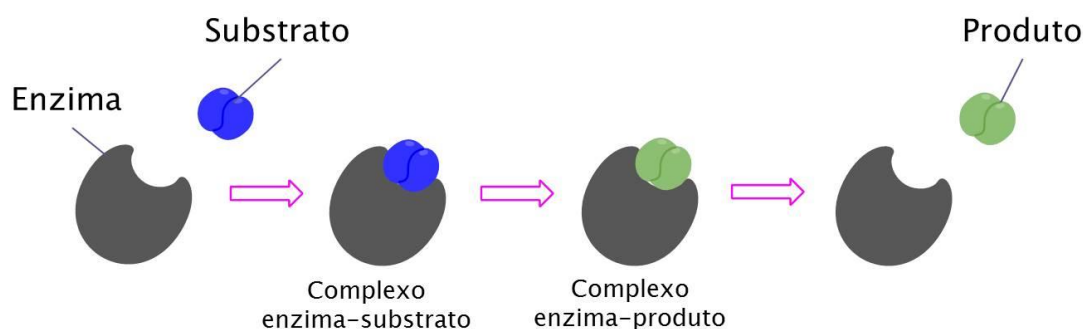


FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REAÇÃO ENZIMÁTICA  
FONTE: AUTORIA PRÓPRIA.

Pelo fato das enzimas serem biocompatíveis, biodegradáveis e derivadas de fontes renováveis, tem sido utilizadas em diversas áreas de interesse. Além disso, o rápido desenvolvimento da engenharia genética e de métodos de triagem de alto desempenho tem estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia das enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde, de biotecnologia e do meio ambiente.

Na área da saúde, enzimas são consideradas alvos atrativos da terapia medicamentosa por seus papéis fundamentais em processos metabólicos e em fisiopatologias. O tratamento de diversas doenças através de intervenção quimioterapêutica, por inibição seletiva de enzimas envolvidas em processos vitais, tem sido explorado com sucesso na medicina moderna e é bem representado pelo grande número de fármacos em uso clínico que atuam como inibidores enzimáticos. Um estudo apontou que aproximadamente 47% das drogas em uso clínico apresentam ação terapêutica derivada da inibição enzimática (Hopkins & Groom, 2002). Assim, a necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de agentes que atuem como inibidores, e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente à enzima em estudo torna-se interessante para a indústria farmacêutica (Copeland, 2005).

Enzimas são também amplamente exploradas na área de biotransformação de substâncias orgânicas, ou biocatálise em química orgânica, a qual pode ser entendida como o uso de catálise enzimática para realizar modificações em substâncias orgânicas. A justificativa para a utilização de biocatálise em transformações orgânicas é a grande diversidade e número de enzimas disponíveis na natureza, junto aos avanços na biotecnologia e engenharia de proteínas que tornam possível a produção de enzimas por preços comerciais aceitáveis e a manipulação das mesmas para exibirem as propriedades desejadas. Esta técnica apresenta várias vantagens, como condições reacionais brandas, menor produção de rejeitos industriais tóxicos e reações altamente específicas. Entre as desvantagens está a perda de atividade enzimática com o tempo e maior dificuldade no desenvolvimento de processos envolvendo microorganismos em cultivo. Entretanto, em muitos casos as vantagens predominam, e tem levado a indústria químico-farmacêutica a desenvolver processos biocatalíticos para a obtenção de substâncias ativas, o que tem se tornado uma tecnologia importante para alcançar a

grande demanda de moléculas químicas verdes e sustentáveis (Faber, 2004; Oliveira & Oliveira, 2012; Sheldon & Van Pelt, 2013).

Na biotecnologia, a ação catalítica enzimática é explorada principalmente para fins de biossíntese ou biocatálise. Na indústria alimentícia, enzimas isoladas ou um conjunto delas presente em microorganismos são aplicadas para a produção de cervejas, fermentos, amaciantes de carne, adoçantes, queijos, entre outros alimentos e insumos. Na indústria farmacêutica, a aplicação é feita da mesma forma para produção de vacinas, hormônios, esteróides, antibióticos e outros agentes terapêuticos, ou para a detecção de analitos explorada em métodos de diagnóstico. Nas indústrias alimentícia, têxtil e de papel as enzimas tem sido usadas resultando em significativas reduções de custos (Hasan et al., 2006). Uma outra aplicação enzimática importante é na indústria de biocombustíveis, para produção de fontes de energia renováveis, como o bioetanol e o biodiesel, derivados de matérias orgânicas (Kelly & Baldwin, 1991; Pandey et al., 2006).

Este conjunto de aplicações demonstra o caráter multidisciplinar das enzimas, e justifica estudos contínuos de exploração de suas atividades e características.

### 3.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA E REATORES DE ENZIMA IMOBILIZADA

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula em um suporte, o qual pode estar livre ou no interior de um reator como parte de um sistema analítico. Enzimas imobilizadas são um exemplo, e podem ser usadas de maneira aberta (*batch-wise experiments*) ou empacotadas em colunas como reatores de enzima imobilizada (IMER – *immobilized enzyme reactors*). Este sistema caracteriza-se por uma enzima ligada em um suporte adequado, tornando-se um catalisador confinado em uma matriz, capaz de ser usado repetidamente pelo tempo que permanecer ativo (Bertucci et al., 2003; Girelli & Mattei, 2005; Cardoso et al., 2009).

A utilização de um sistema de CLAE tendo como fase estacionária um biorreator ou IMER pode ser chamada de cromatografia de afinidade analítica, cromatografia de afinidade quantitativa ou biocromatografia. Esse método em escala analítica consiste de uma coluna cromatográfica, empacotada com um suporte no

qual uma enzima está imobilizada, acoplada ao sistema CLAE entre o injetor e o detector. Ao ser injetado nesse sistema, o substrato natural enzimático, ou outra substância de interesse, é convertido em produto ao entrar em contato com a enzima imobilizada. O consumo do substrato ou a síntese do produto podem então ser detectados diretamente por um detector adequado acoplado ao sistema CLAE, ou as substâncias envolvidas podem ser convertidas em um derivado detectável através de reação com reagente adicionado previamente à fase móvel (Girelli & Mattei, 2005; Cardoso et al., 2009).

Desta forma, IMER podem ser aplicados como uma alternativa para reduzir custos e tempo de análise, e para tornar o processo enzimático economicamente viável para operar de modo *on-line*. A técnica de cromatografia de afinidade acoplado a um IMER fornece seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima, além de reprodutibilidade obtida através da combinação da especificidade e de seletividade da reação enzimática. (Cardoso et al., 2009). Outras vantagens incluem alta estabilidade, confiabilidade e alta performance, que são fatores importantes para a precisão e reprodutibilidade de medições experimentais. (Girelli & Mattei, 2005; Cardoso et al., 2009).

### 3.2.1 Aplicações das enzimas imobilizadas

Enzimas imobilizadas e IMER são amplamente usados em biocatálise, bioprocessamento e detecção bioespecífica. Muitas destas aplicações são similares às apresentadas para as enzimas livres, principalmente aquelas relacionadas à biotecnologia e ao desenvolvimento de novas drogas.

Como citado anteriormente, a necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa por agentes terapêuticos que atuam como inibidores enzimáticos, e o desenvolvimento de técnicas de triagem de substâncias inibidoras é oportuno (Hodgson et al., 2005; Robertson, 2005). Métodos amplamente conhecidos, como radioquímicos e espectrométricos, são empregados para avaliação da atividade e inibição enzimática, sendo a maioria deles baseado em colorimetria e fluorimetria utilizando placas multipoços. Apesar de eficientes, estes métodos possuem desvantagens, como a necessidade de agentes colorimétricos ou fluorimétricos, e de grande quantidade de enzima purificada, a qual não pode ser



posteriormente reutilizada. Além disso, estes métodos clássicos são mais passíveis de sofrer interferências, podendo ocorrer resultados falsos-positivos ou atenuação dos sinais de interesse, e ainda tendem a ser afetados pela variação da atividade enzimática e baixa reprodutibilidade (Hodgson et al., 2005). Para contornar a maioria destas desvantagens a técnica de CLAE acoplada a um reator de enzima imobilizada tem sido apontada como promissora. Este método permite a reutilização da enzima imobilizada, e que a reação enzimática seja realizada de modo contínuo e automático, reduzindo o tempo de reação e permitindo a rápida triagem de inibidores (Nie & Wang, 2009). Além disso, os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos de ação de fármacos, como absorção, distribuição, metabolismo, modulação e ativação do receptor, são dinâmicos na natureza e têm muito em comum com os mecanismos básicos envolvidos em cromatografia líquida. As principais interações intermoleculares, como as eletrostáticas, hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio, são determinantes tanto nos processos biológicos quanto nos cromatográficos. (Cardoso et al., 2009). Com isso, os IMER, integrados a CLAE, representam uma solução atrativa e versátil para a triagem rápida de substâncias naturais e sintéticas com atividade biológica, possibilitando que mais substâncias possam ser testadas contra um alvo biológico em particular (Guido et al., 2010). Esta aplicação dos IMER na triagem de inibidores enzimáticos é uma das áreas mais exploradas, e tem sido realizada com diferentes enzimas, envolvidas em diversas funções metabólicas e patologias (Bartolini et al., 2009; Nie & Wang, 2009; Sima et al., 2011; Mazzini et al., 2011).

Para a triagem de inibidores enzimáticos, os IMER devem ser submetidos ao processo esquematizado na figura 2. Primeiramente o substrato enzimático é injetado no sistema, na presença do cofator quando necessário, e se liga ao sítio ativo da enzima imobilizada com formação do produto. Como a coluna enzimática é submetida a um fluxo constante de fase móvel, tanto o produto como o excesso de substrato e de cofator são posteriormente liberados da coluna. Através de detector adequado, é possível determinar a atividade do reator enzimático pelo consumo do substrato e cofator ou pela formação do produto. Num segundo momento, a mesma quantidade de substrato deve ser injetada no sistema na presença da substância teste com potencial de inibição. O consumo do substrato e do cofator ou a produção do produto neste caso devem ser comparados ao encontrado para a injeção anterior

na ausência do potencial inibidor, e caso estes parâmetros estejam reduzidos, a substância teste poderá ser considerada um inibidor da enzima imobilizada em questão.

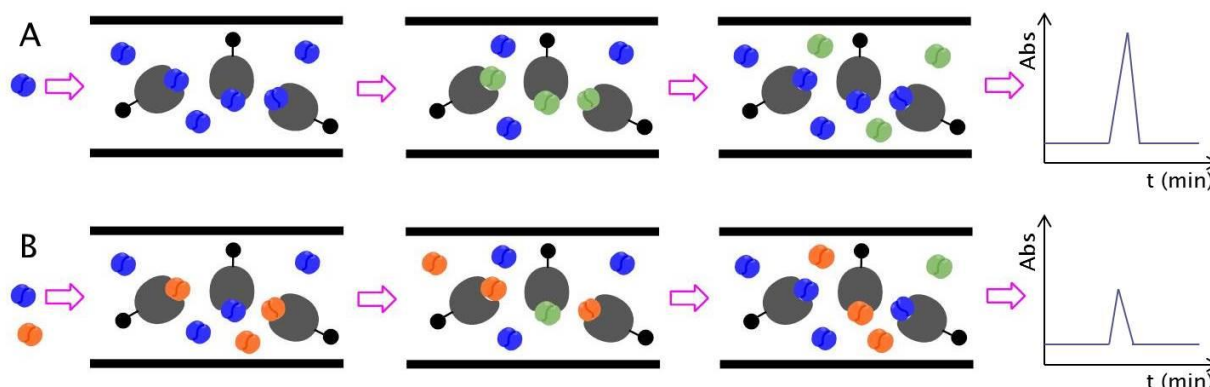


FIGURA 2 – APLICAÇÃO DE IMER NA TRIAGEM DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS COM DETECÇÃO DA FORMAÇÃO DO PRODUTO

NOTA: Exemplo de IMER acoplado a CLAE-DAD. A) Substrato (azul) é injetado no reator de enzima (cinza) imobilizada em suporte adequado (bola preta ligada à enzima). Produto (verde) é formado e posteriormente liberado do sítio ativo enzimático. Cromatograma (Absorvância *versus* tempo) contendo o pico do produto acusa a formação do mesmo. B) Substrato e substância teste (alaranjado) são injetados juntamente no IMER. O produto é formado em menor quantidade e seu pico no cromatograma encontra-se reduzido, caracterizando inibição enzimática pela substância teste

FONTE: AUTORIA PRÓPRIA.

Enzimas imobilizadas e seus reatores também são extensivamente aplicados na área de biocatálise de substâncias orgânicas. Para o uso efetivo das enzimas nesta área, esses agentes catalíticos devem ser estabilizados e funcionais nas condições do processo, e a imobilização facilita o alcance destas necessidades. Dentre as vantagens da imobilização enzimática para biocatálise está a reutilização da enzima, o aumento do volume específico de carga biocatalítica e a simplificação da recuperação do biocatalisador (Liese & Hilterhaus, 2013). Além disso, o manuseio da enzima na forma sólida imobilizada é mais fácil do que na forma líquida livre, o que facilita a separação do biocatalisador do produto desejado, minimizando ou até mesmo eliminando a contaminação proteica do produto. A reutilização da enzima imobilizada reduz custos em operações contínuas, e este fato, associado ao aumento da performance enzimática, reflete em maior produtividade catalítica (Sheldon & Van Pelt, 2013), compensando as desvantagens da técnica como o alto custo dos suportes de imobilização e o processo complexo para a obtenção dos reatores. Diversos autores tem aplicado enzimas imobilizadas para biocatálise de

produtos de interesse com resultados favoráveis e esta técnica (Zhang et al., 2011; Urrutia et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Outra área de aplicação de enzimas imobilizadas é na detecção e purificação de analitos ou derivados, atuando como biossensores. Estes são considerados ferramentas analíticas poderosas por fazerem uso do bioreconhecimento, que resulta em respostas rápidas e sensíveis, combinando a seletividade das reações bioquímicas enzimáticas com a simplicidade operacional (Lima et al., 2007). Esta técnica é bastante explorada na área ambiental (Yang et al., 2013), de alimentos (Antiochia et al., 2013) e farmacêutica (Girelli et al., 2009; Radhapyari et al., 2013). Além disso, pode ser aplicada na resolução quiral de misturas racêmicas através da enantioseletividade apresentada pelos biossensores enzimáticos (Félix & Descorps, 1999; Massolini et al., 2001).

### 3.2.2 Técnicas de imobilização enzimática

Como previamente citado, enzimas imobilizadas e IMER tem se mostrado uma alternativa útil e economicamente viável para os métodos convencionais enzimáticos. Para obtenção de reatores de enzimas funcionais que possam ser aplicados nas diferentes áreas de interesse, um fator importante é a estratégia de imobilização e a estrutura do suporte utilizado, já que esta determina a acessibilidade do substrato ao sítio ativo enzimático (Gabrovska et al., 2008).

Os vários métodos de imobilização baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a enzima e o suporte, e dentre eles destacam-se os baseados em adsorção física, ligação covalente e ligação cruzada (Iqbal et al., 2013). A imobilização por ligação covalente é um dos métodos mais utilizados no preparo de IMER. Esta envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima (Křenková & Foret, 2004). As principais vantagens desta interação é a minimização da dessorção da enzima imobilizada, a diminuição da velocidade de desativação espontânea, além de aumentar o tempo de vida útil e a estabilidade térmica do biorreator. As regiões enzimáticas geralmente envolvidas no acoplamento covalente com o suporte são o grupo amino, carboxil, hidroxila, imidazol ou tiol (Křenková & Foret, 2004; Cardoso et al., 2009).

Vários suportes são comercialmente disponíveis ou tem sido especificamente desenvolvidos para os processos de imobilização, como matrizes de sílica, suportes monolíticos cromatográficos, resinas de agarose, e membranas artificiais de imobilização (Cloix & Wainer, 2001; Nie & Wang, 2009; Calleri et al., 2011). Matrizes de sílica derivatizadas são os suportes mais comumente usados, e os grupos funcionais envolvidos são geralmente amino, epoxi, carboxil, diol ou fenólicos (Girelli & Mattei, 2005). Dentre estes, os grupos reativos amino e epoxi são considerados bastante adequados para a ligação enzimática. No caso de matrizes ligadas a grupos aminopropil, a reação inicia-se com ativação com glutaraldeído, carbonato de *N,N'*-dissuccinilimidila (DSC) ou carbonato de *N,N'*-dissuccinilimidila (DSS), com posterior ligação covalente da enzima ao novo grupo funcional terminal. Para a síntese de matrizes com grupo epoxi terminal, reagentes como o (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano podem ser usados. Esta sílica derivatizada com grupos epoxi (epoxisílica) tem sido usada para imobilização de diferentes enzimas com resultados satisfatórios (Félix & Descorps, 1999; Mateo et al., 2000; Andrisano et al., 2001; Massolini et al., 2001; Mateo et al., 2007; Nie & Wang, 2009). O processo de imobilização enzimática em epoxisílica inicia-se pela adsorção física inicial da enzima no suporte seguida pela formação da ligação covalente entre os grupos funcionais enzimáticos e a densa camada de grupos epoxi da matrix (Mateo et al., 2000). No fim do processo de imobilização, grupos epoxi que não reagiram com a enzima devem ser bloqueados por ligação com grupos tiol ou amino de outras substâncias simples, para prevenir reações descontroladas futuras com o suporte (Bertucci et al., 2003; Barbosa et al., 2013).

Independente do tipo de ligação entre a enzima e o suporte, a imobilização enzimática para o desenvolvimento de reatores pode ser realizada pelas técnicas *in situ* ou *in batch*. Quando o processo *in batch* é empregado, a enzima é primeiramente imobilizada no suporte para depois ocorrer o empacotamento deste na coluna usando um processo de imobilização úmido. Enquanto que, na técnica *in situ*, a enzima é diretamente imobilizada na coluna pré-empacotada com o suporte (Calleri et al., 2004a; Girelli & Mattei, 2005; Cardoso et al., 2009; Nie & Wang, 2009). Ambas as técnicas são aplicadas e a escolha da melhor condição depende da enzima a ser imobilizada.

## 4 REATORES DE TIROSINASE IMOBILIZADA

### 4.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 4.1.1 Tirosinase

Uma das enzimas potencialmente úteis para alvo farmacológico é a tirosinase (EC 1.14.18.1). Esta catalisa a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois (atividade monofenolásica) e a oxidação destes a *o*-quinonas (atividade difenolásica) usando oxigênio molecular (Espin et al., 2000; Fenoll et al., 2001). A tirosinase é amplamente distribuída na natureza, e é responsável pela melanização da pele, dos olhos e dos cabelos, e também pelo escurecimento de frutas e vegetais (Seo et al., 2003). A fonte mais comum de tirosinase é o cogumelo *Agaricus bisporus* (Figura 3), o qual é usualmente processado como pó após extração com acetona antes da purificação da enzima (Atlow et al., 1984; Seo et al., 2003; Yamazaki & Itoh, 2003; Simsek & Yemenicioglu, 2007).



FIGURA 3 – COGUMELO *Agaricus bisporus*  
FONTE: FLICKR (2013)

A tirosinase é uma enzima representante das metaloproteínas que contém cobre. O sítio ativo da tirosinase é formado por dois átomos de cobre II coordenados a três moléculas de histidina, as quais estão ligadas a matriz proteica (Figura 4) (Akyilmaz et al., 2010; Deeth & Diedrich, 2010). A molécula pode se apresentar em três diferentes formas: oxi ( $E_{OX}$ ,  $[Cu^{II}-O_2-Cu^{II}]$ ), met (I e II) ( $E_M$ ,  $[Cu^{II}-Cu^{II}]$ ) e deoxi ( $E_D$ ,  $[Cu^I-Cu^I]$ ) (Sendovski et al., 2011). Na forma  $E_{OX}$ , dois átomos de oxigênio

formam pontes laterais entre os átomos de cobre (Figuras 4 e 5-C). Somente esta forma da proteína é capaz de catalisar as reações de hidroxilação e oxidação de moléculas, sendo considerada a forma mais ativa da enzima (Solomon et al., 1996; Deeth & Diedrich, 2010).

A forma  $E_M$  pode conter uma (met I) ou duas ligações (met II) em forma de ponte com grupos hidroxila entre os átomos de cobre (Figura 5-A). Essas formas met I e II são capazes de catalisar somente a oxidação de moléculas, ou seja, apresentam somente atividade difenolásica. Já a forma  $E_D$  da enzima é a forma reduzida inativa, que não apresenta ligações em forma de ponte entre os átomos de cobre (Figura 5-B) (Decker et al., 2006).

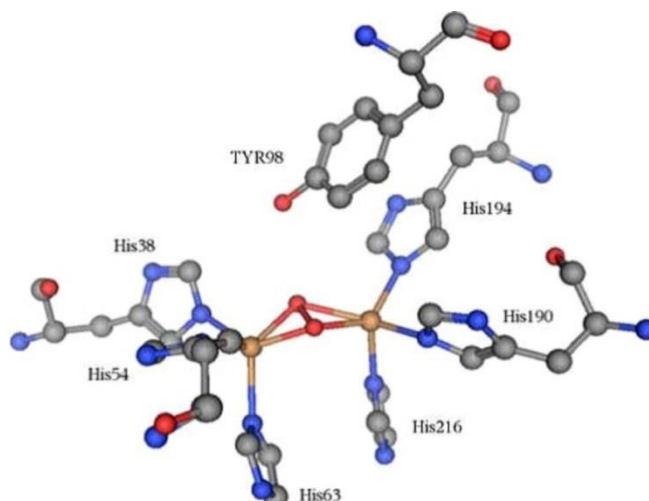


FIGURA 4 – SÍTIO ATIVO DA TIROSINASE NA FORMA ATIVA  $E_{OX}$

NOTA: Átomos de  $Cu^{II}$  (alaranjado).

FONTE: DEETH e DIEDRICH (2010)

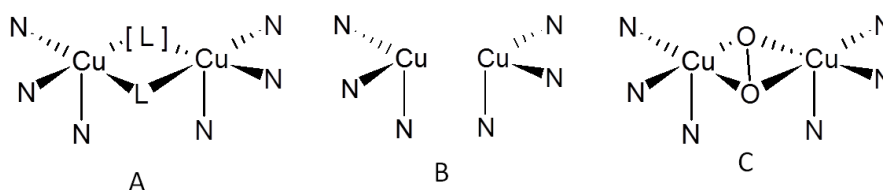


FIGURA 5 - FORMAS  $E_M$  (A),  $E_D$  (B) E  $E_{OX}$  (C) DA TIROSINASE

NOTA: L – grupo hidroxila.

Na forma  $E_{OX}$ , os dois átomos de cobre II estão pentacoordenados, e possuem dois elétrons desemparelhados na camada de valência, necessários para a ligação com o substrato. Átomos de cobre II pentacoordenados caracterizam moléculas com variações angulares entre a geometria piramidal e bipiramidal trigonal, com pequena variação de energia entre as mesmas (Deeth & Diedrich,

2010). As três formas da tirosinase se interconvertem durante a ação enzimática (Figura 6) (Decker et al., 2006). O esquema da figura 6 apresenta o mecanismo de ação da tirosinase na hidroxilação e oxidação de monofenóis e difenóis, respectivamente.

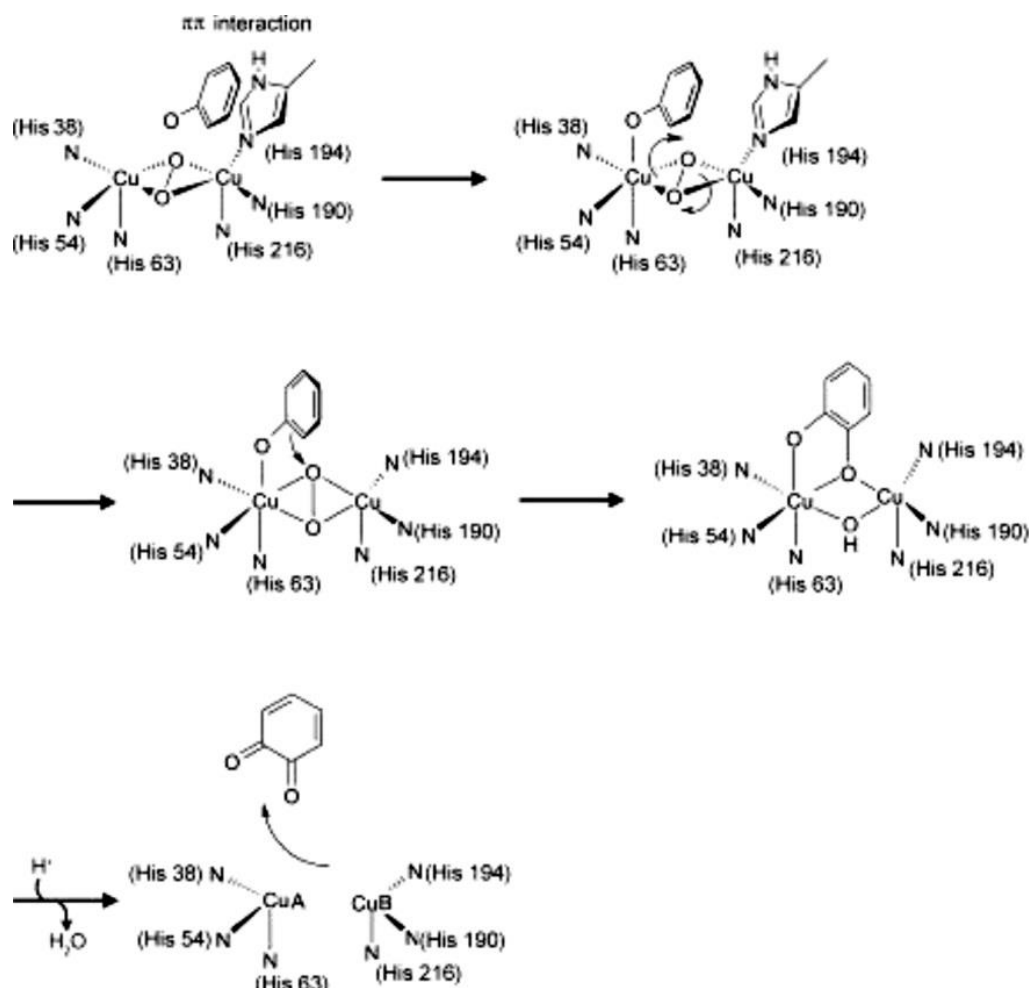


FIGURA 6 – HIDROXILAÇÃO E OXIDAÇÃO DE UM MONOFENOL À QUINONA CORRESPONDENTE PELA TIROSINASE

FONTE: DECKER, SCHWEIKARDT e TUCZEK (2006)

Estudos da tirosinase proveniente de *A. bisporus* sugerem que a enzima possui massa molecular de 110-120 kDa, e que ocorre como uma proteína tetramérica composta por duas subunidades de 43-48 kDa e duas subunidades de 13,4 kDa. Wichers e colaboradores (1996) isolaram de *A. bisporus* dois monômeros da tirosinase de 43 kDa sob condição desnaturante, e de 47 kDa na forma nativa. Os monômeros apresentaram pI de 5,2 e 5,1 e atividades mono e difenolásica similares (Wichers et al., 1996).

#### 4.1.2 Tirosinase na melanogênese

A tirosinase é a principal enzima envolvida na síntese da melanina, catalisando duas etapas importantes da reação. A primeira delas, limitante da melanogênese, é a hidroxilação da tirosina a L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) ou diretamente a o-dopaquinona. A o-dopaquinona é convertida a L-DOPA, ou a dopacromo através de auto-oxidação em pH fisiológico. A L-DOPA também é substrato da tirosinase, sendo oxidada a o-dopaquinona enzimaticamente. Esta é posteriormente convertida à dopacromo espontaneamente em pH fisiológico. Finalmente, a eumelanina é formada através de uma série de reações oxidativas a partir do di-hidroindol (DHI) e do ácido di-hidroindol-2-carboxílico (DHICA), os quais são formados a partir do dopacromo. Na presença de cisteína e de glutatona, a dopaquinona é convertida em cisteinildopa ou glutationildopa, a partir das quais a feomelanina é formada. A quantidade de eumelanina e de feomelanina formadas determina a aparência fenotípica do indivíduo (Kim & Uyama, 2005; Chang, 2009) (Figura 7).

A melanina é o pigmento mais bem distribuído na natureza, e pode ser encontrada em bactérias, fungos e plantas, e em animais ocorre principalmente na orelha interna, nos olhos, no cabelo e na pele de mamíferos (Hoogduijn et al., 2004). Este pigmento é uma importante defesa da pele contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (UV), já que é capaz de absorver e refletir raios UV e captar espécies reativas de oxigênio (ERO). Por esse motivo, a produção e a distribuição anormal da melanina causam uma série de problemas na pele, podendo aumentar a incidência de doenças malignas, como o melanoma, e prejuízos à pele provocados pelo UV (Virador et al., 1999; Zhang et al., 2009). Além disso, a pigmentação em humanos desempenha um papel estético importante, que pode ser comprometido em certas situações de hipo e de hiperpigmentação, como vitiligo, sardas e manchas relacionadas à idade e à inflamações na pele (Virador et al., 1999; Lee et al., 2007). A hiperpigmentação, caracterizada pelo acúmulo anormal de melanina na pele, é uma dessas condições indesejadas que tem encorajado pesquisadores na busca por inibidores da tirosinase que atuem reduzindo a biossíntese de melanina.



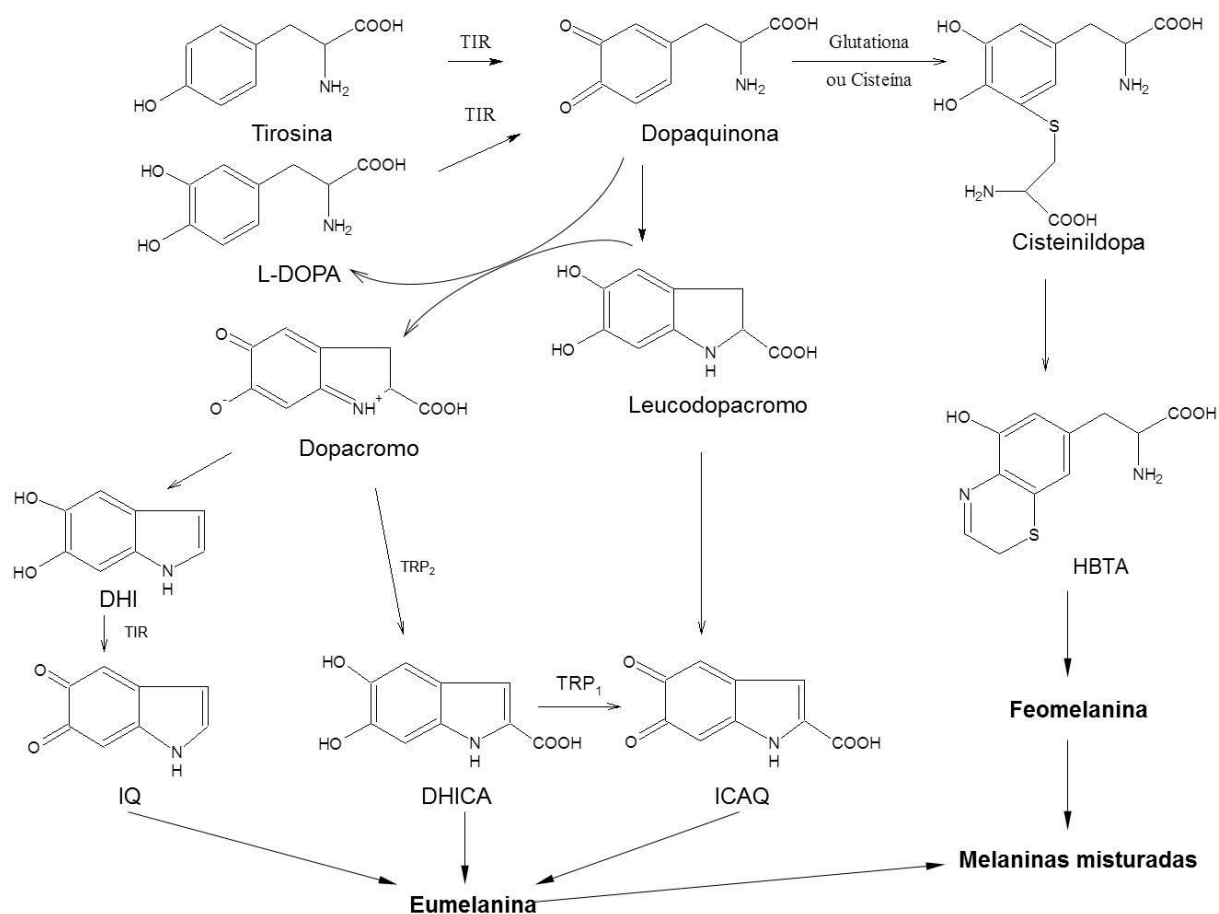


FIGURA 7 - BISSÍNTESE DA MELANINA

NOTA: TIR: tirosinase; TRP<sub>1</sub> e TRP<sub>2</sub>: proteínas relacionadas à tirosinase; L-DOPA: 3,4-di-hidroxifenilalanina; DHI: 5,6-di-hidroindol; IQ: indol-5,6-quinona; DHICA: ácido 5,6-di-hidroindol-2-carboxílico; ICAQ: ácido indol-2-carboxílico-5,6-quinona; HBTA: 5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina.

#### 4.1.3 Inibidores da tirosinase

Inibidores da tirosinase tem sido objetivo de muitos estudos por modularem a ação enzimática na melanogênese, e várias classes dessas substâncias são descritas na literatura. Eles podem ser diferenciados como: agentes redutores, que causam redução da *o*-dopaquinona à L-DOPA; sequestrantes da *o*-dopaquinona, como certos tio- derivados; substratos enzimáticos alternativos, como os compostos fenólicos, cujos produtos quinóides de reação absorvem numa diferente faixa espectral que o dopacromo; inativadores não-específicos enzimáticos, como alguns ácidos e bases que desnaturam a enzima; inativadores específicos da tirosinase, também chamados de substratos suicidas, já que se ligam irreversivelmente à enzima; e inibidores específicos da tirosinase, que se ligam reversivelmente à tirosinase reduzindo sua capacidade catalítica (Chang, 2009; Khan, 2012).

Os inibidores são classificados como competitivos, incompetitivos, de ação mista e não-competitivos. Os inibidores competitivos combinam-se com a enzima livre de maneira a impossibilitar a ligação do substrato. Tanto o inibidor como o substrato são exclusivos, porque competem pelo mesmo sítio ativo na molécula enzimática. Exemplos de inibidores competitivos da tirosinase são os quelantes de cobre, análogos não-metabolizáveis ou derivados de substratos. Os inibidores incompetitivos ou incompetitivos podem se ligar somente ao complexo enzima-substrato, sendo um tipo de inibição bastante raro. Os inibidores mistos possuem ação competitiva e incompetitiva ao mesmo tempo, podendo se ligar a enzima livre ou ao complexo enzima-substrato com constantes de ligação diferentes. Inibidores não-competitivos não se ligam ao sítio ativo enzimático, e podem se ligar tanto a enzima livre como ao complexo enzima-substrato com a mesma constante de equilíbrio (Lehninger et al., 2007; Chang, 2009).

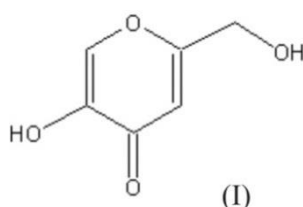
A força de inibição de uma substância é geralmente expressa com o valor de  $CI_{50}$ , que é a concentração do inibidor necessária para inibir metade da atividade enzimática nas condições de teste. Porém, os valores de  $CI_{50}$  na literatura para os inibidores da tirosinase são incomparáveis devido as condições experimentais variáveis, como diferentes concentrações do substrato, tempos de incubação e fontes enzimáticas. Por isso, na maioria dos trabalhos para a descoberta de novos inibidores, o ácido kójico, um inibidor conhecido da tirosinase, é usado como controle positivo, e para estimar a força de inibição da nova substância seu valor de  $CI_{50}$  é comparado ao do ácido kójico (Chang, 2009).

Os polifenóis são a maior classe de substâncias inibidoras da tirosinase. Dentre eles, os flavonóides são os derivados fenólicos mais estudados, com ênfase para as subclasses flavonas, flavonóis, flavanonas e flavanóis. Estas substâncias se distinguem por alterações em suas estruturas, as quais determinam o potencial de inibição enzimático. Os flavonóis, bem representados pela quercetina, geralmente causam inibição competitiva da enzima e atuam quelando o íon cobre do sítio ativo (Lin et al., 2008; Gillbro & Olsson, 2011). Outros flavonóis, como derivados di-hidro, rhamnetina e tamarixetina, entre outros, foram também relatados com esta ação inibidora (Saewan et al., 2011). Flavonas, flavanonas e flavanóis extraídos de espécies vegetais também apresentam ação inibidora da tirosinase, incluindo a

nobiletina, a naringenina e a hesperitina (Sasaki & Yoshizaki, 2002; Zhang et al., 2007).

Os derivados de benzaldeídos e de benzoatos, como o ácido benzóico, o ácido cinâmico, o ácido gálico e o ácido *p*-coumárico, caracterizam outra classe de inibidores da tirosinase, os quais atuam ligando-se diretamente ao sítio ativo enzimático ou por inibição não-competitiva (Lim et al., 1999; Kubo et al., 2000; Kubo et al., 2003; Nguyen et al., 2012). Esteróides e lipídeos de cadeia longa, como a trilinoleína, também podem causar inibição da enzima por ligarem-se a sítios da tirosinase diferentes do ativo, sendo caracterizados como inibidores não-competitivos (Hyung et al., 2006; Lin et al., 2008; Chang, 2009). Inibidores irreversíveis da tirosinase, que ligam-se covalentemente à enzima, são bastante raros, sendo o captopril um exemplo (Espín & Wichers, 2001).

A hidroquinona (1,4-di-hidroxibenzeno) é um conhecido inibidor da tirosinase e tem sido o tratamento convencional para tratar hiperpigmentação por mais de 40 anos (Amer & Metwalli, 1998; Haddad et al., 2003). Esta substância interage com a tirosinase por ligação com os resíduos de histidina do centro ativo enzimático, resultando em inibição enzimática e redução da pigmentação. Adicionalmente, a hidroquinona induz a formação de ERO, resultando em prejuízo oxidativo à tirosinase (Palumbo et al., 1991). Porém, o uso desta substância para tratamento da hiperpigmentação tem sido limitado, por causar perda permanente de melanócitos pelo dano oxidativo causada a membrana lipídica, levando a perda irreversível da pigmentação da pele. Além disso, quando usada a longo prazo pode causar o cronose exógena, uma doença caracterizada pelo acúmulo de fenóis com formação de máculas marrom-acinzentadas ou preto-azuladas em áreas cutâneas (Arndt & Fitzpatrick, 1965; Bucks et al., 1988; Wester et al., 1998).



O ácido kójico (I), inibidor da tirosinase mais amplamente estudado, é um metabólito de fungo usado em produtos para clareamento da pele e também como

aditivo de alimentos para prevenir o escurecimento provocado pela enzima. Esta substância apresenta efeito inibitório competitivo com a tirosinase, explicado por sua habilidade de quelar o cobre do sítio ativo da enzima (Marshall, 1991; Cabanes et al., 1994; Orio et al., 2011). Por outro lado, apesar do ácido kójico ser um tratamento popular para melasmas, pode causar dermatite, sensibilização e eritema (Nakagawa & Kawai, 1995; Badreshia-Bansal & Draelos, 2007). E seu uso como aditivo de alimentos deve ser controlado, já que a administração oral do ácido kójico em animais foi relacionada a indução de tumor de tireóide e de fígado (Fujimoto et al., 1998; Takizawa et al., 2003; Takizawa et al., 2004).

Pelo fato de muitas drogas comercialmente usadas para tratamento de distúrbios hiperpigmentares, como a hidroquinona e o ácido kójico, apresentarem efeitos indesejados que limitam sua aplicação clínica, a busca por novas substâncias para tratar estas patologias é oportuna. Muitas substâncias de origem natural ou sintética, caracterizadas como inibidores da tirosinase, não apresentam perfil e força de inibição necessárias para serem submetidas a testes farmacológicos e clínicos. Por isso, a triagem de novos inibidores é estimulada e tem sido uma prática contínua, realizada por métodos envolvendo tanto a enzima na forma livre (Matos et al., 2012; Yao et al., 2012) como na forma imobilizada.

#### 4.1.4 Imobilização da tirosinase

A tirosinase tem sido imobilizada em diferentes tipos de suporte para aplicação em diversas áreas de interesse. Esta enzima tem recebido atenção por ser uma alternativa viável e ambientalmente correta para a biocatálise de catecóis e quinonas a partir de fenóis, o que usualmente é difícil de ser alcançado por síntese química. Guazzaroni e colaboradores (2012) imobilizaram a tirosinase em resina epoxidada Eupergit C250L e revestiram o catalisador imobilizado pela técnica “camada-por-camada” (*layer-by-layer*). O catalisador final foi usado para síntese aberta (*batch-wise*) eficiente e seletiva de catecóis bioativos (Guazzaroni et al., 2012). Outros autores apresentaram a imobilização da tirosinase por interação hidrofóbica com esferas de vidro recobertas por D-sorbitol cinamoilado. Estas esferas foram aplicadas *in batch* para a produção de o-difenóis (Marín-Zamora et al., 2005; Marín-Zamora et al., 2006; 2009). Donato e colaboradores (2012) imobilizaram

a tirosinase na superfície interna de membranas de zeolite, e empregaram o sistema para a produção de L-DOPA, que é uma droga de interesse para o tratamento da doença de Parkinson, a partir de L-tirosina (Donato et al., 2012).

Trabalhos também tem sido conduzidos para aplicação da tirosinase imobilizada como biossensor para detecção de fenóis, os quais são considerados poluentes ambientais de águas superficiais e profundas e tem apresentados efeitos prejudiciais à saúde de animais. Imobilização por ligação cruzada da tirosinase em polipirrol foi base para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para substâncias fenólicas (Apetrei et al., 2011). A detecção de substâncias fenólicas também foi explorada através de biossensores de tirosinase imobilizada em silicato mesoporoso MCM-41 (Mangrulkar et al., 2012), e em nanofilmes compostos por nanopartículas de níquel carbono-quitosana-revestidas (CNI) (Yang et al., 2012). Tirosinase imobilizada em matrix de quitosana derivatizada com glutaraldeído (Ensuncho et al., 2005), em aluminosilicato de sódio (NaA) e de cálcio (CaA) quimicamente modificados, e em sílica gel (Seetharam & Saville, 2003) foi aplicada para a biodegradação desses fenólicos poluentes.

Triagem de inibidores enzimáticos também é uma das aplicações da tirosinase imobilizada. Sima e colaboradores (2011) imobilizaram a tirosinase em partículas magnéticas de estreptoavidina ativadas com glutaraldeído para a detecção de inibidores enzimáticos (Sima et al., 2011).

Porém, em todas as aplicações descritas acima, a tirosinase imobilizada foi usada para operação em modo aberto (*batch-wise*), e não no interior de colunas como IMER. O desenvolvimento de reatores de tirosinase imobilizada somente foi realizado até o momento por Girelli e co-autores. Este grupo imobilizou a tirosinase em suporte de vidro com porosidade controlada (*controlled pore glass*, CPG) ligado a grupos aminopropil, alquilamino, carboxil ou arilamina, e derivatizado com glutaraldeído. Este suporte foi empacotado numa coluna cromatográfica, e o reator foi acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência, sendo este sistema aplicado para a remoção de fenóis (Girelli et al., 2006; 2007a; Girelli et al., 2007b) ou para determinação de polifenóis em chás preto e verde (Girelli et al., 2009).

Como citado anteriormente, a necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa por agentes terapêuticos que atuam como inibidores enzimáticos, e o desenvolvimento de técnicas de alta performance para triagem de

substâncias inibidoras é oportuno. Este é o primeiro trabalho de desenvolvimento de IMER de tirosinase para triagem de inibidores, em busca de novos agentes para tratamento de desordens hiperpigmentares, e para a prevenção do escurecimento enzimático de alimentos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Materiais

A enzima tirosinase usada nos experimentos de imobilização foi extraída de *A. bisporus*, e purificada parcialmente a partir de técnicas otimizadas, as quais estão descritas nos itens a seguir. *A. bisporus* fresco foi obtido comercialmente (Curitiba-PR) e imediatamente congelado para preservação da atividade enzimática. Uma amostra foi mantida no laboratório para fins de identificação e comparação futura. Tirosinase de cogumelo (Sigma-Aldrich T3824) foi usada como padrão.

Albumina de soro bovino (BSA), L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA), glicina, ácido kójico e (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTMS) foram obtidos da Sigma-Aldrich. LiChrosorb Si 100 (10 µm) foi obtido da Merck. Filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com tamanho de poro de 0,45 µm, usados para filtração de soluções enzimáticas, suspensões de epoxisílica e fases móveis para CLAE, foram obtidos da Millipore. O sistema CLAE utilizado foi da marca Varian®, modelo compacto 920-LC, composto por bomba quaternária, detector de arranjo de diodos (DAD) e injetor automático. Colunas de aço inoxidável vazias para CLAE (50 mm x 4.6 mm; 75 mm x 4.6 mm; 100 mm x 4.6 mm) e acessórios cromatográficos foram obtidos da Chrom Tech (Apple Valley, MN). Algumas colunas vazias utilizadas foram obtidas através de desempacotamento e reaproveitamento de colunas comerciais prontas fora de uso. Todas as soluções foram preparadas usando água destilada e purificada em sistema Millipore Milli-Q. Todos os outros reagentes químicos eram grau analítico ou CLAE e usados sem purificação prévia.

#### 4.2.2 Teste de atividade de tirosinase no *Agaricus bisporus* comercial

Primeiramente, testou-se a atividade de tirosinase no cogumelo comercial (Marin-Zamora et al., 2006). O cogumelo congelado foi triturado em grau de porcelana. A 600 mg de conteúdo sólido foram adicionados 16 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,0 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, KOH para pH 7,0). A solução foi mantida por 30 min em agitação magnética a 4 °C, e foi centrifugada a 4000g por 6 min. A solução enzimática obtida foi testada com relação a atividade de tirosinase (Sarkar et al., 2006; Oliveira et al., 2013), e para tanto, foi dividida em quatro alíquotas de 4 mL. Três delas (testes) foram adicionadas de 0,1% (m/v) de L-DOPA em tampão fosfato 100 mM pH 7,0, e a última (controle) foi adicionada somente de tampão fosfato 100 mM pH 7,0. Todas as soluções foram mantidas em estufa a 37 °C por 20 min. Controle da oxidação espontânea da solução de L-DOPA 0,1% (m/v) em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 também foi realizado nas condições de análise. Em seguida, as soluções tiveram a absorvância lida em 475 nm, sendo usado tampão fosfato 100 mM pH 7,0 como branco.

#### 4.2.3 Purificação parcial da tirosinase de *Agaricus bisporus*

##### 4.2.3.1 Pó após extração com acetona *versus* extrato liofilizado

Testou-se primeiramente a melhor maneira de processar e armazenar o *A. bisporus* para manutenção da atividade de tirosinase. As formas comparadas foram pó de *A. bisporus* após extração com acetona (PA) e extrato liofilizado (EL). Para ambas o cogumelo foi previamente congelado e triturado em um processador caseiro.

O EL foi preparado a partir de 100 g de *A. bisporus* triturado. A esta massa foram adicionados 500 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM, KOH para pH 7,0), e a suspensão foi agitada magneticamente por 30 min a 4 °C. O extrato foi filtrado à vácuo em filtro Whatmann nº1 e imediatamente congelado. Após isso, foi liofilizado num liofilizador de bancada Labconco FreeZone 1 L, numa temperatura de -50 °C e bomba de vácuo Labconco 117 L/min. O EL obtido foi mantido a temperatura  $\leq -4$  °C em embalagem fechada até o uso. Para as análises

necessárias, 8 mg de EL foram diluídos em 4 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0. Alíquota de 1 mL desta solução foi usada para determinação de proteína total pelo método de biureto (Dawson et al., 1984) e 2,5 mL foi usado para determinação da atividade enzimática.

O PA foi preparado a partir de 80 g de *A. bisporus* triturado. Esta massa foi extraída três vezes por sonicação em banho de gelo por 10 min com 100 mL de acetona gelada (temperatura  $<0^{\circ}\text{C}$ ). A cada extração foi realizada filtração à vácuo em filtro Whatmann nº1. Os filtrados orgânicos foram descartados, e o PA obtido foi distribuído numa superfície para secagem da acetona remanescente à temperatura ambiente. O material foi então armazenado a temperatura  $\leq -4^{\circ}\text{C}$  em embalagem fechada até o uso (Yemenicioglu et al., 1997; Yamazaki & Itoh, 2003; Simsek & Yemenicioglu, 2007). Para as análises necessárias, 100 mg de PA foi extraído com 10 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0 por 35 min, a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  sobre agitação magnética. A solução enzimática obtida foi centrifugada, alíquota de 1 mL foi usada para determinação de proteína pelo método de biureto e 2,5 mL para determinação da atividade enzimática.

Para determinar a atividade enzimática do EL e do PA, uma alíquota de 2,5 mL das soluções preparadas foi adicionada de 2,5 mL de solução de L-DOPA 0,5 mM. A solução teve a absorvância *versus* tempo imediatamente lida por 5 min, em 475 nm a  $37^{\circ}\text{C}$ . Obtiveram-se curvas cinéticas para cada reação enzimática. Foram selecionadas as porções lineares (fase log;  $r^2 > 0,99$ ) de cada curva, e a absorvância inicial e final num intervalo de 1 min foram plotadas numa curva de calibração de dopacromo para calcular a quantidade formada desta substância neste intervalo de tempo de reação enzimática. A atividade enzimática foi descrita como a quantidade de dopacromo formado por minuto e por mg de proteína ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min/mg proteína), tendo-se como base a quantidade de proteína nas alíquotas de 2,5 mL usadas para determinação da atividade enzimática.

Dopacromo foi sintetizado a partir da oxidação química completa de 10 mL de L-DOPA 2,5 mM com 10 mL de periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) 5,0 mM em tampão fosfato 10 mM pH 6,0 (Graham & Jeffs, 1977; Kagedal et al., 1995; Girelli et al., 2007a). A solução de dopacromo obtida foi imediatamente diluída para a faixa de concentração 25-250  $\mu\text{M}$ , e as soluções tiveram a absorvância lida em 475 nm para a curva de calibração.



A atividade enzimática do PA e do EL foi determinada da forma descrita nos dias 1, 2, 3, 7, 14, 28 e 60 após o preparo, para assim ser determinada a forma que melhor mantém a atividade de tirosinase. Os testes de atividade de tirosinase foram realizados em triplicata e os dados obtidos para cada dia foram analisados estatisticamente pelo método de ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

#### 4.2.3.2 Otimização da extração de tirosinase do PA

A extração da tirosinase do PA foi otimizada por planejamento fatorial de experimentos. A geração das matrizes de planejamentos e o tratamento dos dados foram feitos utilizando o módulo “Design of Experiments” do programa MINITAB 15 (Minitab Inc.). Na primeira etapa (triagem), os fatores (variáveis) que influenciam de maneira significativa o rendimento da extração enzimática foram determinados através de planejamento experimental em dois níveis. As variáveis avaliadas foram tempo (t), temperatura (T), pH, concentração do tampão (CT) e massa de PA (m). PA foi produzido como previamente descrito e submetido à extração de tirosinase nas diferentes condições apresentadas na tabela 1. O volume de extração foi sempre de 10 mL, e as extrações foram conduzidas com agitação magnética e posterior centrifugação do extrato por 6 min a 4000g.

Para determinar a atividade enzimática de cada extrato, uma alíquota de 2,5 mL foi adicionada de 2,5 mL de solução de L-DOPA 0,5 mM, e a solução teve a absorvância *versus* tempo imediatamente lida por 5 min, em 475 nm a 37 °C. A partir das absorvâncias obtidas e de uma curva de calibração de dopacromo, calculou-se a atividade enzimática dos extratos como nmol de dopacromo formado por minuto por mg de PA (nmol/min/mg PA).

TABELA 1 – FATORES E RESPECTIVOS NÍVEIS AVALIADOS NA ETAPA DE TRIAGEM DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA A EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE *Agaricus bisporus* APÓS EXTRAÇÃO COM ACETONA

FATOR	A	B
Tempo (t) (min)	10	30
Temperatura (T) (°C)	4	20
pH	5	7
Concentração do tampão (CT) (mM)	10	50
Massa (m) (g/150 mL)	1,5	3,0

Os fatores que alteraram significativamente a extração da tirosinase de PA na etapa de triagem foram selecionados para a etapa de otimização, que foi realizada utilizando os modelos de planejamento de composto central (*central composite design*). Cada fator foi variado em cinco níveis, e as extrações foram conduzidas em condições diferentes (Tabela 2), segundo o mesmo procedimento usado na etapa de triagem. Tampão fosfato pH 7,0, temperatura de extração de 4 °C, e massa de PA na proporção 1,5 g/150 mL ou 1 % (m/v) foram condições usadas selecionadas a partir dos resultados da etapa de triagem. A atividade enzimática dos extratos foi calculada da mesma forma realizada na etapa de triagem.

TABELA 2 – FATORES E RESPECTIVOS NÍVEIS AVALIADOS NA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA A EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE *Agaricus bisporus* APÓS EXTRAÇÃO COM ACETONA

FATOR	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Tempo (t) (min)	15,86	20	30	40	44,14
Concentração do tampão (CT) (mM)	7,93	10	15	20	22,07

NOTA: n=5 para o ponto central,  $\alpha=0,3566$ . Ponto central (0), pontos cúbicos (-1, +1) e pontos axiais (- $\alpha$ , + $\alpha$ ).

Os resultados de atividade enzimática obtidos foram utilizados para obtenção de gráficos de mapas de contorno. A análise dos resultados permitiu estabelecer o método com as melhores condições para obtenção de um extrato de PA rico em tirosinase.

#### 4.2.3.3 Precipitação da tirosinase com sulfato de amônio

Para maior purificação enzimática a partir do extrato de tirosinase de PA foi aplicada a técnica de precipitação de proteínas pelo fenômeno de *salting out*. Para tanto, o extrato de PA, obtido a partir das condições previamente otimizadas, foi submetido à precipitação de proteínas com sulfato de amônio. Foram feitas adições progressivas de 20% (m/v) deste sal, de acordo com tabelas de precipitação, até 80% (m/v). Partiu-se de 70 mL de solução enzimática, que, após cada adição salina, foi mantida em agitação magnética por 30 min a 4 °C, e em seguida centrifugada a 4000g por 15 min na mesma temperatura. Os precipitados (Ppt), re-suspensos em 10 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0, e os sobrenadantes (Sob) obtidos após

cada adição de 20% (m/v) de sal foram avaliados quanto ao teor de proteínas pelo método de biureto (Dawson et al., 1984) e quanto a atividade enzimática. Para a determinação da atividade enzimática, 2,0 mL do sobrenadante ou da solução do precipitado foram adicionadas de 2,0 mL de solução de L-DOPA 0,5 mM, e fez-se a leitura da absorvância *versus* tempo em 475 nm a 37 °C. O cálculo da atividade enzimática foi realizado como descrito anteriormente a partir de uma curva de calibração de dopacromo. Com os resultados obtidos, avaliou-se a força iônica necessária para a precipitação da tirosinase e determinou-se a melhor concentração de sulfato de amônio para obtenção de precipitado rico em tirosinase.

#### 4.2.3.4 Método estabelecido para purificação parcial da tirosinase de *Agaricus bisporus*

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de purificação parcial da tirosinase, foram definidas as condições para obtenção de precipitado rico da enzima, o qual foi usado para os experimentos de imobilização em colunas de CLAE. A figura 8 mostra o esquema que resume o processo.

Para os experimentos de imobilização, o precipitado enriquecido com tirosinase foi resuspenso em tampão fosfato 15 mM pH 7,0, a solução foi dialisada contra o mesmo tampão *overnight*, adicionada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a concentração final de 2,5 mM, e filtrada por filtro Millipore de poro 0,45 µm de diâmetro.

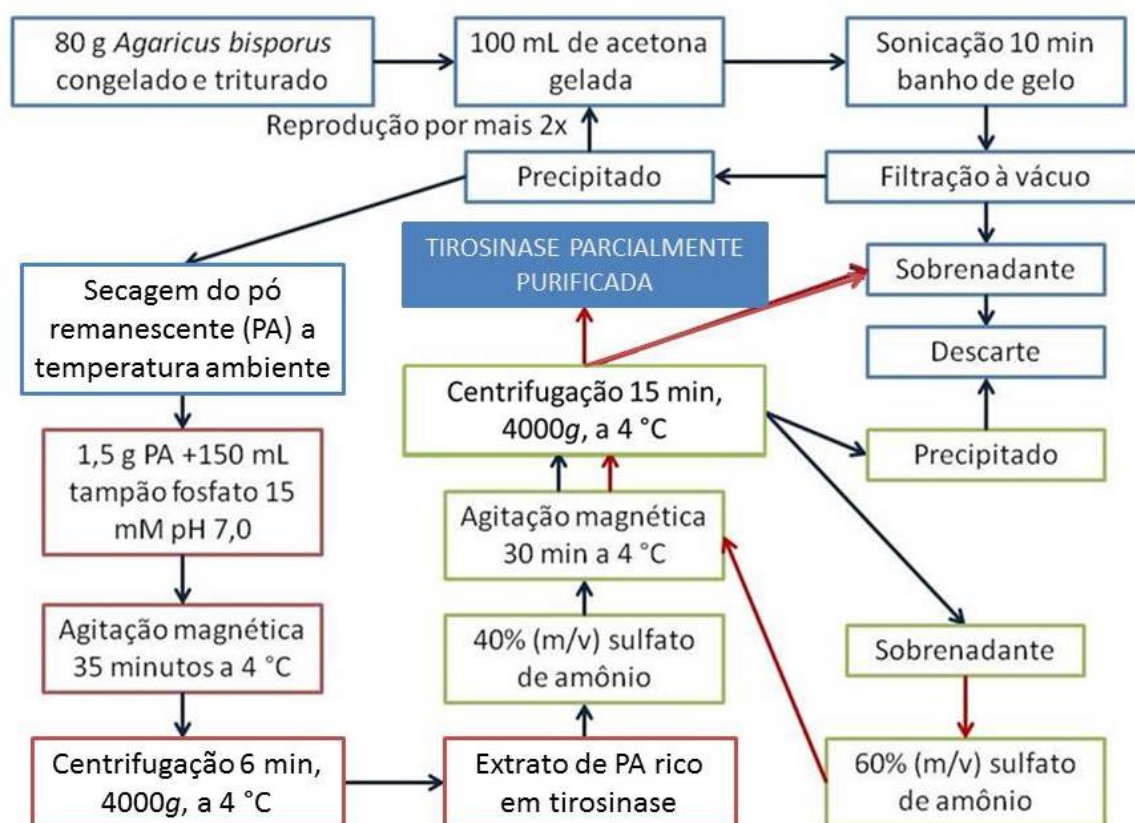


FIGURA 8 – ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO PARCIAL DA TIROSINASE DE *Agaricus bisporus*  
 NOTA: Quadros em azul – produção do pó de *Agaricus bisporus* após extração com acetona (PA);  
 Quadros em vermelho – extração enzimática do PA; Quadros em verde – precipitação da tirosinase  
 com sulfato de amônio. Rotas (setas) em vermelho representam a etapa final.

#### 4.2.4 Atividade enzimática na presença de DTE, EDTA, EGTA E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A atividade enzimática do extrato de PA e da tirosinase parcialmente purificada segundo o esquema detalhado na figura 8 foi testada na presença de ditioeritritol (DTE), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Para tanto, um extrato enzimático de PA foi preparado pelo método previamente otimizado e parte deste extrato (solução enzimática impura - SE) foi usada para teste de atividade enzimática. Outra parte (300 mL) foi submetida à precipitação de tirosinase com sulfato de amônio para obtenção da tirosinase mais purificada, a qual foi posteriormente re-suspensa em 100 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0 (solução de tirosinase enriquecida - ST).

Para determinação da atividade enzimática controle, 2,5 mL de SE e de ST foram adicionados de 2,5 mL de solução de L-DOPA 0,5 mM, e a absorvância *versus*

tempo em 475 nm a 37 °C foi lida em triplicata. A atividade enzimática ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min/mg proteína) foi calculada a partir de uma curva de calibração de dopacromo. Para as soluções de SE e ST adicionadas dos testes DTE, EDTA, EGTA e  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas concentrações finais de 0,5 e 2,5 mM, a determinação da atividade enzimática foi realizada da mesma forma que para o controle. Soluções contendo SE ou ST e as substâncias testes, na ausência de L-DOPA, também foram preparadas como branco. O teor de proteína foi determinado pelo método de biureto (Dawson et al., 1984). A partir dos resultados de atividade enzimática na presença dos testes em comparação com o controle foi possível determinar a ação dos testes na atividade de tirosinase.

#### 4.2.5 Cinética da enzima livre

Os parâmetros cinéticos  $V_{\text{max}}$  (velocidade máxima da reação enzimática) e  $K_m$  (concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima) da tirosinase parcialmente purificada livre foram determinados. Para tal, a enzima obtida segundo o procedimento da figura 8, previamente re-suspensa em 50 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0 para concentração final de proteína de 0,7 mg/mL, foi colocada em contato com concentrações crescentes de L-DOPA (0,0625 - 25 mM). A reação enzimática foi acompanhada por 3 min em 475 nm a 37 °C, e calculou-se a partir de uma curva de calibração de dopacromo a atividade enzimática ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min) para cada concentração de substrato. Os resultados foram estatisticamente analisados e usados para construção de uma curva cinética de Michaelis-Menten. Análise por regressão não-linear foi aplicada para determinar os valores de  $V_{\text{max}}$  e  $K_m$ .

#### 4.2.6 Desenvolvimento dos reatores de tirosinase imobilizada

O suporte usado para a imobilização da tirosinase foi a epoxisílica, a qual foi sintetizada pela técnica de refluxo ou por aquecimento em micro-ondas. A imobilização neste suporte foi testada pelos métodos *in situ* e *in batch*. Análise dos IMER desenvolvidos pelas diferentes técnicas foi realizada com relação ao teor de enzima imobilizada, atividade enzimática retida, atividade catalítica do reator

enzimático, cinética, e estabilidade. A partir dos resultados obtidos, definiu-se o melhor método de imobilização da tirosinase e o melhor reator para ser aplicado na triagem de inibidores.

#### 4.2.6.1 Síntese da epoxisílica por refluxo

Massa de 1,5 g de sílica Lichrosorb Si 100, previamente seca em estufa por 15 h a 120 °C, foi adicionada de 12 mL de tolueno seco e 1 mL de solução de GPTMS 10% (v/v) em tolueno. A suspensão foi submetida à refluxo por 10 h e filtrada a vácuo em papel filtro Millipore 0,45 µm. A epoxisílica formada foi lavada com tolueno e hexano, sendo posteriormente seca e armazenada a temperatura ambiente. (Félix & Descorps, 1999; Andrisano et al., 2001).

#### 4.2.6.2 Síntese da epoxisílica por micro-ondas

Massa de 1,5 g de sílica Lichrosorb Si 100, previamente seca em estufa por 15 h a 120 °C, foi adicionada de 9,75 mL de metanol e 0,25 mL de GPTMS. A mistura foi agitada por 10 min e, após isso, evaporou-se o solvente em rotaevaporador, com temperatura máxima de 60 °C. A sílica recoberta pelo GPTMS foi então aquecida em micro-ondas por 5 min a 400 W, e a epoxisílica formada foi lavada com metanol, acetona e éter, com filtração a vácuo em filtro Millipore 0,45 µm. Após isso, a epoxisílica foi seca e armazenada a temperatura ambiente (Crosfield & Sons, 1992).

#### 4.2.6.3 Empacotamento das colunas cromatográficas

A coluna a ser empacotada (75 mm x 4,6 mm) foi conectada em sua porção superior à outra coluna menor (50 mm x 4,6 mm). Epoxisílica foi adicionada até completar ambas as colunas, as quais foram acopladas à bomba de CLAE na posição vertical. Metanol e água, respectivamente, foram os dois solventes usados no empacotamento, sendo bombeados pelas colunas num fluxo de até 10 mL/min, com pressão controlada de até 200 bar. Após isso, a coluna superior de 5,0 cm foi desacoplada, e a coluna inferior empacotada com aproximadamente 0,5 g de

epoxisílica foi devidamente condicionada com tampão fosfato 15 mM pH 7,0 para os experimentos.

#### 4.2.6.4 Imobilização antes do empacotamento – método *in batch*

Uma massa de 2,5 g de epoxisílica sintetizada por refluxo foi adicionada de 25 mL de solução de tirosinase em tampão fosfato 15 mM pH 7,0. Esta mistura foi mantida sob agitação a 4 °C por 10 h, e posteriormente filtrada a vácuo em filtro Millipore de poro 0,45 µm de diâmetro. O sólido, correspondente à epoxisílica com tirosinase imobilizada, foi então empacotado em uma coluna cromatográfica de aço inoxidável segundo o procedimento descrito anteriormente, porém usando somente água como solvente. A coluna foi então condicionada com tampão fosfato 15 mM pH 7,0 por 2 h num fluxo de 0,5 mL/min. Solução de glicina 0,1 M foi bombeada pela coluna por 2 h a 0,5 mL/min, e, por fim, a coluna foi condicionada com o mesmo tampão fosfato para serem iniciados os testes de atividade enzimática.

#### 4.2.6.5 Imobilização após o empacotamento – método *in situ*

Epoxisílica, sintetizada por refluxo e/ou por micro-ondas, foi empacotada numa coluna cromatográfica de aço inoxidável de 7,5 cm de comprimento como descrito anteriormente. A coluna foi então condicionada com tampão fosfato 15 mM pH 7,0 por 1 h a 0,5 mL/min. Após isso, 25 mL de solução de tirosinase, mantida a temperatura de 4 °C num banho de gelo, foi re-circulada pela coluna por 10 h a 0,5 mL/min. A coluna foi posteriormente lavada com tampão fosfato 15 mM pH 7,0 por 2 h num fluxo de 0,5 mL/min. Solução de glicina 0,1 M foi circulada pela coluna por 2 h a 0,5 mL/min, e, por fim, a coluna foi condicionada com o mesmo tampão fosfato para serem iniciados os testes de atividade enzimática.

#### 4.2.6.6 Proteína e atividade enzimática removida pela imobilização enzimática

A quantidade de proteína imobilizada (mg proteína/g epoxisílica) foi calculada pela diferença na quantidade de proteína na solução de tirosinase antes e após a imobilização e levando em consideração a quantidade de epoxisílica que

entrou em contato com a solução enzimática durante a imobilização. A determinação de proteína foi realizada pela absorvância a 280 nm, usando-se uma curva de calibração de BSA (Waddell, 1956).

A atividade enzimática ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min/g epoxisílica) retida pelo processo de imobilização foi determinada pela diferença na atividade de tirosinase da solução enzimática antes e após a imobilização, e levando em consideração a quantidade de epoxisílica que entrou em contato com a solução de tirosinase durante a imobilização. A atividade enzimática foi determinada a 37 °C pela absorvância a 475 nm em função do tempo, de uma solução contendo 0,7 mL de L-DOPA 2,0 mM e 0,7 mL da solução de tirosinase. Através de uma curva de calibração de dopacromo obteve-se a quantidade de dopacromo formado por minuto ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min).

#### 4.2.6.7 Atividade e cinética dos reatores enzimáticos

Para determinação da atividade da enzima imobilizada nos reatores, injeções de 20  $\mu\text{L}$  de L-DOPA 2 mM em tampão fosfato 15 mM pH 7,0 foram realizadas. Este mesmo tampão foi usado como fase móvel, num fluxo de 0,5 mL/min, num tempo de corrida total de 5 min. A área do pico de dopacromo, detectado em 475 nm, foi plotada numa curva de calibração de dopacromo (0,05 – 1 mM) para determinação da concentração de produto formada. O tempo de retenção do dopacromo, deduzido do tempo morto do sistema, foi usado como unidade de tempo, e a atividade enzimática foi calculada como  $\mu\text{M}$  dopacromo formado por minuto.

Para determinar as características cinéticas dos IMER, injeções de 20  $\mu\text{L}$  de L-DOPA em diferentes concentrações (0,5 - 25 mM) foram realizadas em triplicata. As atividades enzimáticas ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min) para cada concentração de substrato foram calculadas através da área do pico e de uma curva de calibração de dopacromo. A partir dos resultados obtidos, traçou-se uma curva cinética de Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos  $V_{\text{max}}$  e  $K_m$  foram determinados por análise de regressão não-linear.



#### 4.2.6.8 Estabilidade dos reatores de tirosinase imobilizada

Todos os IMER foram armazenados a 4 °C em solução de azida sódica 0,01% (m/v) em tampão fosfato 15 mM pH 7,0 quando não estavam em uso. Para determinar a estabilidade dos reatores enzimáticos nestas condições, injeções de 20 µL de L-DOPA 2 mM foram realizadas em triplicata em intervalos de tempo dentro de 30 dias. A atividade das colunas (µM dopacromo/min) foi usada como parâmetro de estabilidade.

#### 4.2.7 Aplicação do reator de tirosinase imobilizada

O reator de tirosinase imobilizada foi aplicado na triagem de inibidores enzimáticos. Primeiramente testou-se a sensibilidade do reator a solventes orgânicos quando estes são aplicados na diluição da amostra a ser injetada. Depois, a ação de um inibidor padrão, o ácido kójico, foi determinada na coluna enzimática, com determinação de  $CI_{50}$  e tipo de inibição causada. Posteriormente, outras substâncias de interesse foram testadas com relação aos seus potenciais de inibição.

##### 4.2.7.1 Sensibilidade do reator enzimático a solventes orgânicos

Metanol, acetonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO) tiveram a influência na atividade do reator testada para posterior uso na solubilização das amostras. Foram avaliadas concentrações dos solventes na faixa de 5 a 50% (v/v) na amostra a ser injetada no reator. Para tanto, 500 µL de solução de L-DOPA 10 mM em tampão fosfato 15 mM pH 7,0 foi adicionado de volume adequado do solvente, e tampão fosfato 15 mM pH 7,0 foi usado para completar o volume da solução para 1 mL quando necessário. Solução controle foi composta somente por 500 µL de solução de L-DOPA 10 mM e 500 µL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0. Injeções (20 µL) em triplicata dessas soluções foram realizadas no IMER, e a área do pico de dopacromo foi usada para determinação da atividade enzimática, que foi posteriormente calculada como porcentagem com relação ao controle. A solução controle foi injetada antes e após a injeção das soluções com solventes, a fim de se verificar

prejuízos a enzima imobilizada após os testes. Análise estatística dos resultados foi aplicada para determinar a interferência dos solventes na atividade da enzima imobilizada no reator.

#### 4.2.7.2 Teste do reator de tirosinase imobilizada com inibidor padrão

Ácido kójico foi testado como inibidor padrão da tirosinase, e foi analisado com relação ao  $Cl_{50}$  e ao tipo de inibição causada ao reator de tirosinase imobilizada. Para determinação do  $Cl_{50}$ , 20  $\mu$ L de L-DOPA 10 mM contendo concentrações crescentes de ácido kójico (0,05 – 5 mM), previamente solubilizado em tampão fosfato 15 mM pH 7,0, foram injetados na coluna, em triplicata para cada concentração de inibidor. Controle foi realizado com injeção de L-DOPA 10 mM na ausência de ácido kójico. A redução na área do pico de dopacromo comparado ao controle foi usada para cálculo da porcentagem de inibição para cada concentração de inibidor. Análise estatística foi realizada com os resultados, e o valor de  $Cl_{50}$  foi determinado por regressão não-linear.

O tipo de inibição causada pelo ácido kójico ao IMER foi determinado através da injeção de 20  $\mu$ L de ácido kójico 3 mM contendo concentrações crescentes do substrato L-DOPA (5,0 – 25 mM), em triplicata para cada concentração de substrato. Usando-se o valor de atividade enzimática ( $\mu$ M dopacromo/min) obtida para cada concentração de L-DOPA, uma curva Michaelis-Menten e um gráfico de Lineweaver-Burk foram desenvolvidos, e os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram estabelecidos. Estes valores foram comparados com os obtidos para o IMER na ausência do inibidor, e o tipo de inibição causada pelo ácido kójico foi determinado.

#### 4.2.7.3 Aplicação do reator de tirosinase imobilizada para triagem de inibidores enzimáticos

O reator de tirosinase imobilizada foi aplicado como método para triagem de inibidores enzimáticos. Para tanto, um novo IMER de tirosinase foi desenvolvido em uma coluna de 10 cm de comprimento, da mesma forma descrita anteriormente pelo método *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas. As substâncias químicas

ácido gálico, ácido *p*-coumárico, ácido ascórbico, ácido quínico, naringenina, 2-fenilquinolina, esteviol e ácido betulínico tiveram o potencial inibidor avaliado no reator de tirosinase. Além disso, dois derivados hidroxilados da 2-fenilquinolina (DFQ1 e DFQ2), um deles inédito (DFQ1), obtidos por biotransformação com fungos, e dois derivados inéditos do ácido betulínico (DAB1 e DAB2) obtidos por síntese química também foram testados.

Para tanto, 500 µL de L-DOPA em tampão fosfato 15 mM pH 7,0 foi adicionado de volume adequado de solução estoque da substância a ser testada, e a solução final teve o volume completado para 1 mL com tampão fosfato 15 mM pH 7,0 quando necessário. Metanol (5% v/v) foi usado nas soluções a serem injetadas de ácido gálico, ácido *p*-coumárico e ácido quínico. DMSO foi usado na solução de DFQ1 na proporção de 2,5% (v/v), na solução de naringenina na proporção de 10% (v/v), e nas soluções de 2-fenilquinolina, esteviol, ácido betulínico, DFQ2, DAB1 e DAB2 na proporção de 50% (v/v). Controles com essas concentrações de solvente orgânico foram usados para os experimentos.

As soluções testes e controles (20 µL) foram injetadas em triplicata no reator de tirosinase imobilizada, e a atividade foi determinada pela área do pico de dopacromo. Soluções das substâncias testes sem adição de L-DOPA também foram injetadas no sistema como branco. A porcentagem de inibição para as substâncias testes foi determinada com relação ao respectivo controle. Análise estatística dos resultados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi realizada.

#### 4.2.7.4 Comparação dos resultados obtidos com o método padrão

Os resultados obtidos para os derivados inéditos da 2-fenilquinolina e do ácido betulínico, DFQ1, DAB1 e DAB2, foram confirmados pelo método padrão de determinação da atividade de tirosinase por espectrometria UV descrito na literatura (item 4.2.3.1). Para tanto, volume adequado de solução de L-DOPA para concentração final de 0,5 mM em tampão fosfato 15 mM pH 7,0 foi adicionado do teste para concentração final de 0,25 mM, e de 100 µL de solução de tirosinase isolada de *A. bisporus*. DMSO foi usado para solubilização dos testes na proporção 2,5% (v/v) para o DFQ1, e na proporção 50% (v/v) para o DAB1 e o DAB2. A solução final de volume corrigido para 1 mL teve a absorvância *versus* tempo

imediatamente lida a 475 nm. Controle foi realizado com L-DOPA 0,5 mM na presença dos solventes usados na solubilização das amostras e na ausência dos testes. A atividade da tirosinase foi determinada de forma percentual com relação ao controle, e os resultados de inibição para cada substância foram comparados estatisticamente com aqueles obtidos através do reator de tirosinase imobilizada.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.3.1 Teste de atividade de tirosinase no *Agaricus bisporus* comercial

Antes de se iniciarem os experimentos de purificação da tirosinase do *A. bisporus*, foi verificada a presença de atividade desta enzima numa solução do cogumelo. Para tal, esta solução foi colocada em contato com L-DOPA por tempo adequado, e teve a absorvância lida em 475 nm. Este experimento, e todos os experimentos seguintes que envolvem determinação da atividade de tirosinase, se baseiam na oxidação da L-DOPA pela tirosinase com posterior formação de dopacromo, uma substância de coloração vermelha que possui um máximo de absorção UV em 475 nm (Figura 11) (Kagedal et al., 1995). A absorvância média dos testes foi de  $0,611 \pm 0,0082$ , a do controle foi de 0,08, e a do branco de L-DOPA foi de 0,152. A maior absorvância dos testes caracteriza que o cogumelo comercial apresenta atividade enzimática, e que houve produção de dopacromo catalisada pela tirosinase presente no *A. bisporus*.

##### 4.3.2 Purificação parcial da tirosinase de *Agaricus bisporus*

A purificação parcial da tirosinase de *A. bisporus* foi realizada em três etapas principais. A primeira envolveu o estudo da melhor forma de processamento do *A. bisporus* para manutenção da atividade enzimática. Depois, as condições para extração da tirosinase de *A. bisporus* foram determinadas por planejamento fatorial de experimentos. E por último, fez-se estudo das condições preferenciais para precipitação da tirosinase do extrato enzimático obtido de *A. bisporus*.

#### 4.3.2.1 Pó após extração com acetona versus extrato liofilizado

Duas formas de processamento do *A. bisporus*, extrato liofilizado (EL) e pó após extração com acetona (PA), foram avaliadas quanto à capacidade de manutenção da atividade enzimática. O rendimento de EL foi de aproximadamente 1,24% (m/m) e a de PA de aproximadamente 5% (m/m) com relação à massa inicial de *A. bisporus* usado. Após o preparo do EL e do PA, a atividade enzimática dos mesmos nos dias 1, 2, 3, 7, 14, 28 e 60 foi avaliada. Curvas cinéticas para cada reação enzimática (Figura 9-A) tiveram suas porções lineares selecionadas (Figura 9-B), e a absorvância inicial e final num intervalo de um minuto foi plotada numa curva de calibração de dopacromo (Figura 10), com coeficiente de correlação de 0,9992 e equação da reta  $y=0,003391x - 0,02353$ .

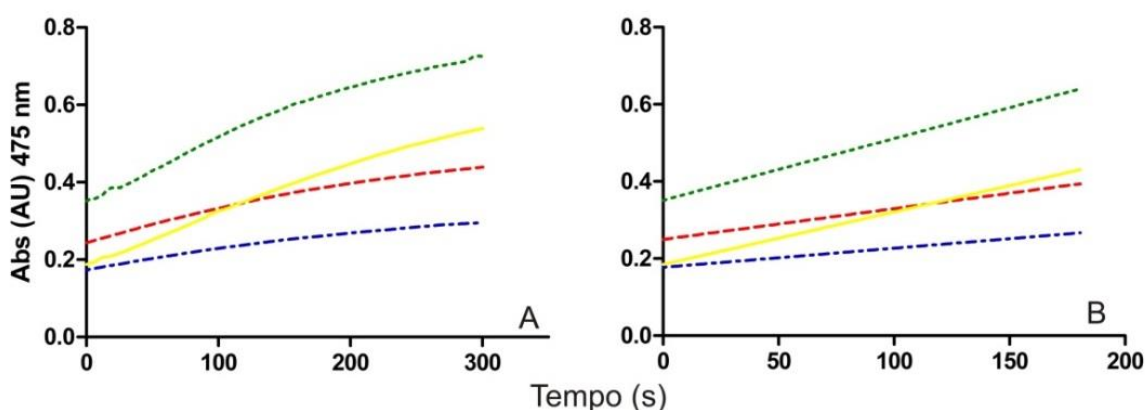


FIGURA 9 - CURVAS CINÉTICAS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA ENVOLVENDO TIROSINASE E SEU SUBSTRATO L-DOPA, COM FORMAÇÃO DE DOPACROMO (A); PORÇÕES LINEARES (FASE LOG) DAS CURVAS CINÉTICAS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA (B)

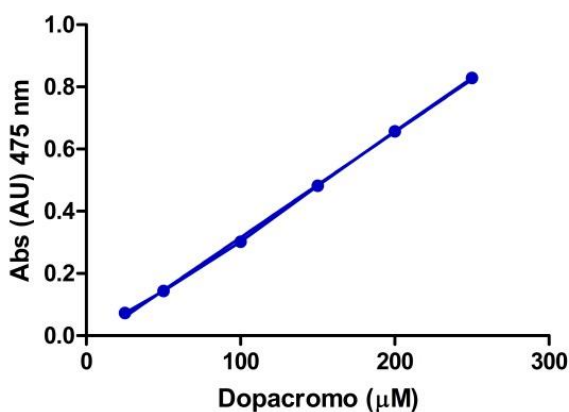


FIGURA 10 – CURVA ANALÍTICA DE DOPACROMO

O padrão sintetizado de dopacromo, utilizado para a curva analítica, apresentou o perfil espectral mostrado na figura 11, o qual está de acordo com o descrito na literatura para esta substância (Graham & Jeffs, 1977; Kagedal et al., 1995). A concentração de dopacromo formada por minuto por mg de proteína foi determinada como atividade enzimática (Figura 13). A curva analítica de BSA (Figura 12), utilizada para quantificação de proteína pelo método de biureto, teve coeficiente de correlação de 0,9953 e equação da reta  $y=0,02397x + 0,01453$ .

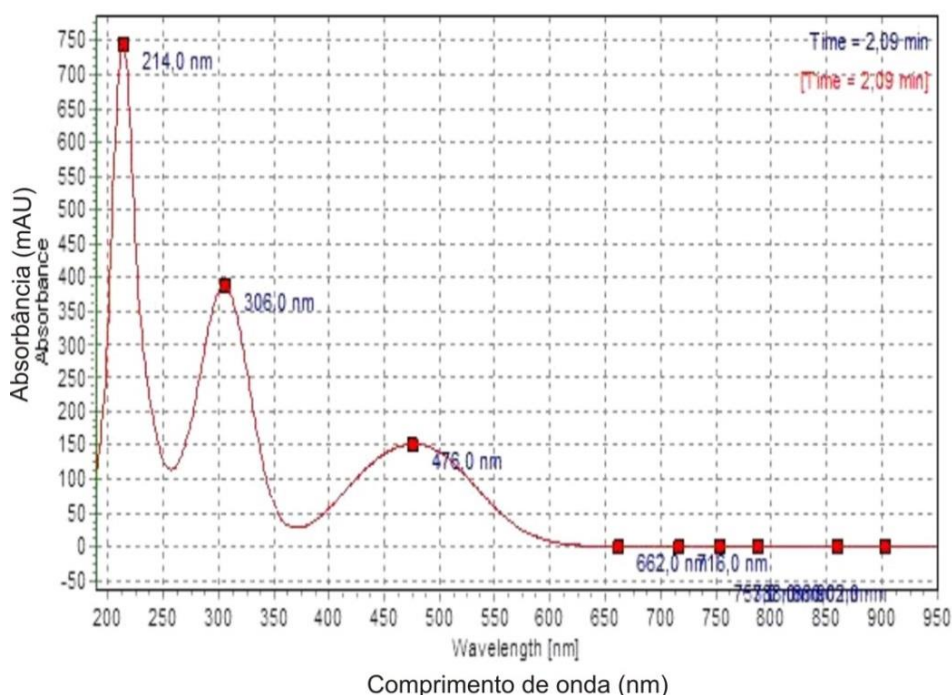


FIGURA 11 – ESPECTRO UV DE DOPACROMO SINTETIZADO A PARTIR DA OXIDAÇÃO COMPLETA DE L-DOPA POR PERIODATO DE SÓDIO

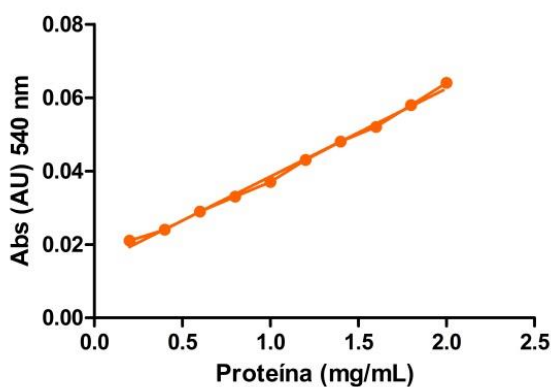


FIGURA 12 - CURVA PADRÃO DE BSA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BIURETO

Através da figura 13 é possível verificar que em 60 dias o PA manteve melhor a atividade enzimática que o EL. A atividade de tirosinase foi mantida sem redução significativa pelo PA. Já o EL apresentou perda significativa da atividade a partir do terceiro dia de armazenamento nas mesmas condições que o PA, com redução da atividade em 30% após 60 dias. Com isso, escolheu-se processar e armazenar o *A. bisporus* na forma de PA para posterior purificação da tirosinase.

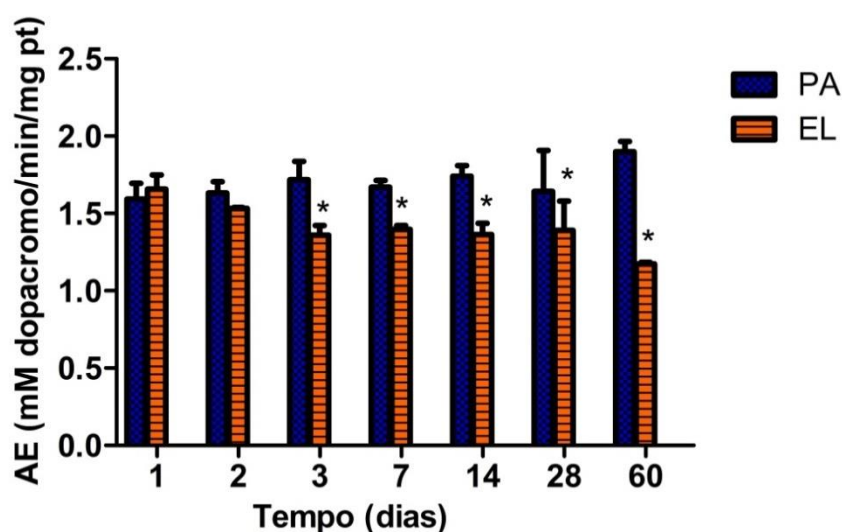


FIGURA 13 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE PÓ DE *Agaricus bisporus* (PA) E DE EXTRATO LIOFILIZADO (EL) DE *Agaricus bisporus* DURANTE 60 DIAS

NOTA: PA e EL foram armazenados a 4 °C em solução de azida sódica 0,01% por 60 dias, e tiveram a AE determinada nos períodos selecionados. Resultados expressos como a média ± DP (n=3; \* $p < 0,05$  comparado ao dia 1).

Um dos motivos da perda de atividade enzimática pelo EL é que, em sua produção, nenhum procedimento de limpeza prévio foi utilizado, ou seja, o extrato aquoso final a ser liofilizado é bruto. Este, além de conter a porção proteica solúvel do cogumelo, possui grande quantidade de outras substâncias solúveis em água a frio, as quais podem ser possíveis substratos/inibidores da tirosinase. Já na produção do PA, a extração prévia com acetona retira grande parte dessas impurezas do cogumelo, prevenindo a perda de atividade. Além disso, no PA a tirosinase ainda se encontra na matriz fibrosa do cogumelo, estando mais protegida de ações deletérias do meio do que na forma de EL, na qual as proteínas já foram extraídas da matriz.

#### 4.3.2.2 Otimização da extração de tirosinase do PA

Muitos autores utilizam PA como forma de processar e armazenar o *A. bisporus* ou outras fontes de tirosinase (Atlow et al., 1984; Yemenicioglu et al., 1997; Yamazaki & Itoh, 2003; Khan et al., 2005; Simsek & Yemenicioglu, 2007; Labus et al., 2011), porém nenhum estudo sobre as melhores condições para realizar a extração de tirosinase de PA foi conduzido até o momento. Neste trabalho, a extração da tirosinase de PA foi avaliada e otimizada por planejamento multifatorial. Esta ferramenta não só define as melhores condições individualmente, como também a interação que os diferentes fatores que influenciam a resposta podem ter entre si.

Na etapa de triagem, após a extração da tirosinase nas diferentes condições descritas na tabela 1, determinou-se a atividade de tirosinase de cada extrato. A partir dos resultados obtidos foram traçados gráficos de efeitos normais (Figura 14), de interações (Figura 15) e de efeitos principais (Figura 16).

A partir do gráfico de efeitos normais (Figura 14) é possível afirmar que somente os fatores tempo de extração e concentração do tampão alteraram significativamente a atividade enzimática dos extratos de tirosinase, sendo que o aumento do tempo para 30 min teve um efeito positivo, e o aumento da concentração do tampão para 50 mM, um efeito negativo. Nenhuma interação significativa ocorreu entre as variáveis testadas (Figura 15), apesar de pequena interação ter ocorrido entre os fatores pH e concentração de tampão, e entre temperatura e massa.

A figura 16 mostra o gráfico de efeitos principais, traçado a partir das médias das atividades enzimáticas obtidas na condição especificada. Quanto maior a inclinação da reta, mais significativa é a influência do fator na extração. A partir deste gráfico é possível observar que, apesar de não alterarem significativamente os resultados, o pH, a temperatura e a massa levaram a melhores resultados nos níveis 7, 4 °C e 1,5 g/150mL, respectivamente. Estas condições foram usadas na etapa de otimização, na qual somente os fatores tempo de extração e concentração do tampão foram variadas em cinco níveis diferentes para a extração da tirosinase de PA.



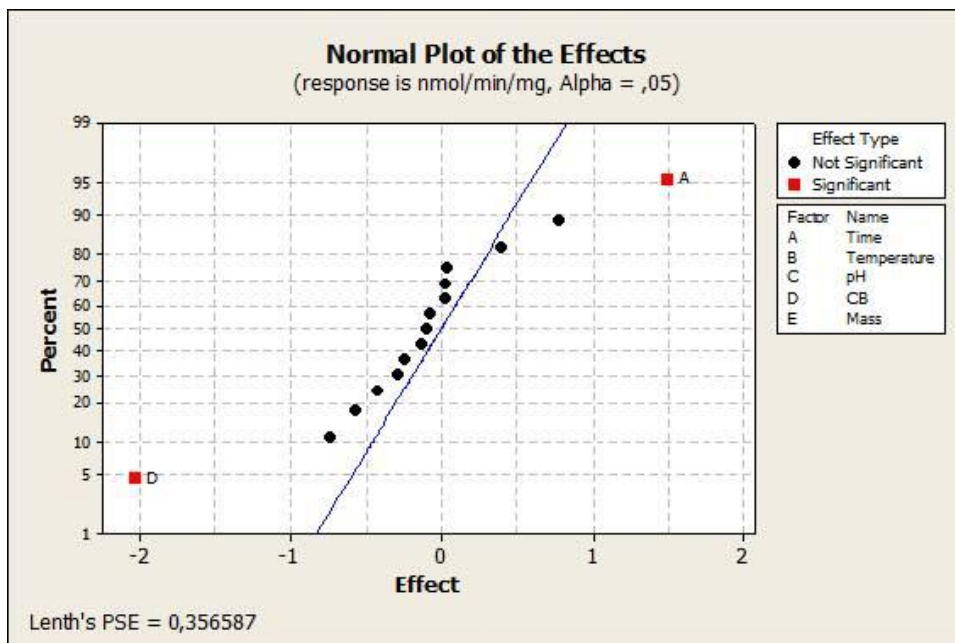


FIGURA 14 – GRÁFICO DE EFEITOS NORMAIS – FATORES QUE INFLUENCIAM NA EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE *Agaricus bisporus*

NOTA: A) Tempo; B) Temperatura; C) pH; D) Concentração do tampão; E) Massa de PA. Pontos pretos – fatores que não afetam significativamente a extração da tirosinase; quadrados vermelhos – fatores que afetam significativamente a extração de tirosinase ( $p < 0,05$ )

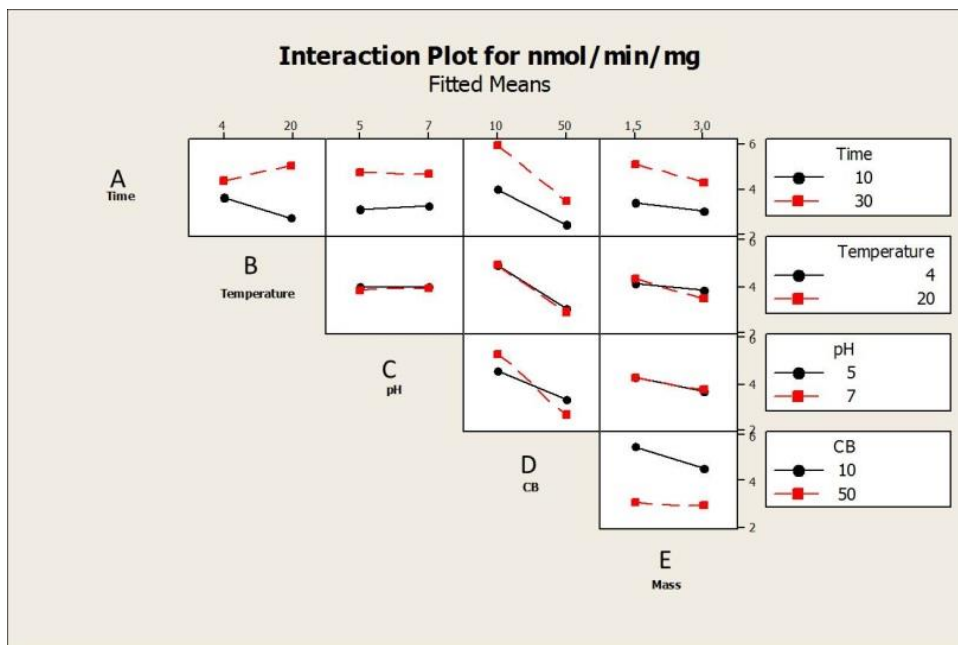


FIGURA 15 – GRÁFICO DE INTERAÇÕES ENTRE OS FATORES AVALIADOS NA EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE *Agaricus bisporus*

NOTA: A) Tempo; B) Temperatura; C) pH; D) Concentração do tampão; E) Massa de PA

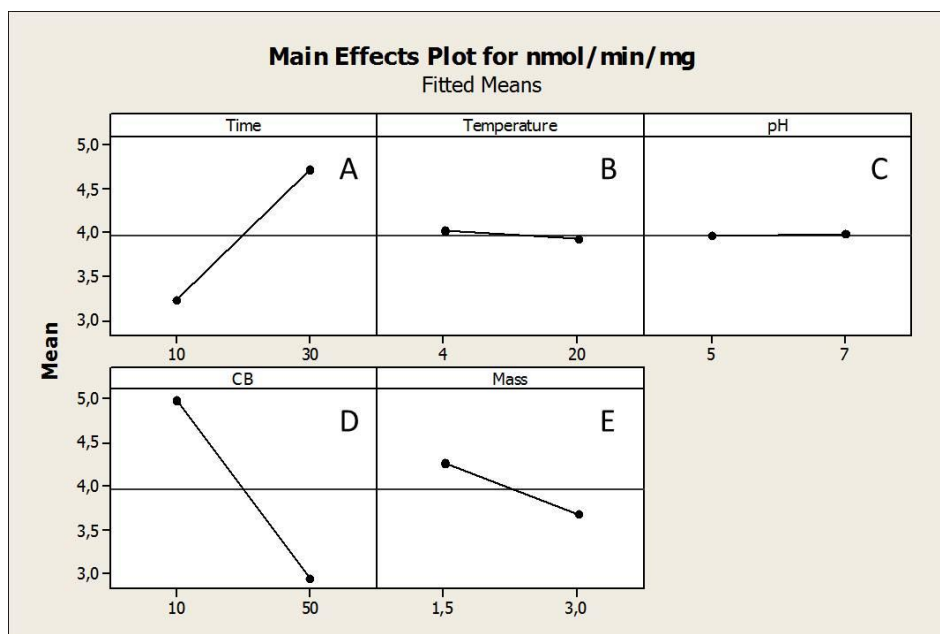


FIGURA 16 – GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS – INFLUÊNCIA DOS FATORES INDIVIDUAIS NA EXTRAÇÃO DA TIROSINASE DE PÓ DE *Agaricus bisporus*  
 NOTA: A) Tempo; B) Temperatura; C) pH; D) Concentração do tampão; E) Massa de PA

A etapa de otimização foi realizada a partir do método de planejamento de composto central, e, com os valores determinados de atividade enzimática para cada extrato obtido pelas diferentes condições descritas na tabela 2, foi traçado um gráfico do tipo mapa de contorno (Figura 17). Este gráfico mostra que os maiores rendimentos na extração da tirosinase, caracterizados pela região verde mais escura do mapa de contorno, foram obtidos com concentração de tampão na faixa de 10 a 17,5 mM, e com tempo de extração maior que 30 min. Com isso, foi selecionada a concentração de tampão intermediária de 15 mM, e tempo de 35 min para a extração de tirosinase de PA, já que tempos de extração muito longos não são vantajosos experimentalmente.

Maiores concentrações de tampão, como 50 mM, são largamente praticadas por outros autores para a extração da tirosinase de PA (Khan et al., 2005; Simsek & Yemenicioglu, 2007). Todavia, os resultados obtidos provam que maiores concentrações reduzem significativamente o rendimento da extração da tirosinase, e que concentrações mais baixas, entre 10 a 17,5 mM, são as ótimas para o propósito.

Com este estudo por planejamento fatorial foram então definidas as condições ótimas para a extração de tirosinase de PA: 1,5 g de pó de *A. bisporus* para 150 mL de tampão fosfato 15 mM pH 7,0 e extração com agitação magnética por 35 min a 4 °C.

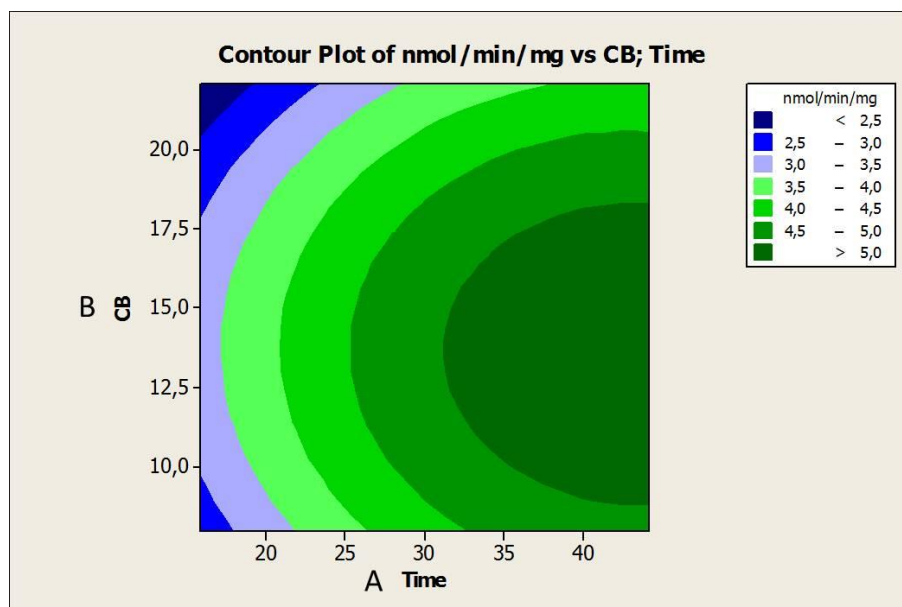


FIGURA 17 – MAPA DE CONTOURNO TEMPO (MIN) (A) VERSUS CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO (mM) (B) – OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE TIROSINASE DE PÓ DE *Agaricus bisporus*

#### 4.3.2.3 Precipitação da tirosinase com sulfato de amônio

O extrato enzimático obtido de PA através do procedimento otimizado por planejamento fatorial contém alta concentração de tirosinase, mas também outras proteínas contaminantes. Com o objetivo de se obter uma solução de tirosinase enriquecida e de eliminar parte dessas proteínas indesejadas, testou-se a precipitação da tirosinase com diferentes concentrações de sulfato de amônio. Este processo se baseia no fenômeno de *salting out*, causado principalmente pela competição entre os íons do sal adicionado com outros solutos, como as proteínas, dissolvidos pelas moléculas de solvatação. Em altas concentrações salinas, maior quantidade de íons adicionados são solvatados e o solvente disponível se torna insuficiente para dissolver outros solutos, os quais precipitam. A precipitação de uma proteína por este processo depende de seu ponto isoelétrico, ou seja, acontece somente quando o grau de solvatação dos íons salinos adicionados atinge um ponto em que a proteína fica em maior quantidade na forma não-ionizada (Voet & Voet, 2006).

Os gráficos das figuras 18, 19 e 20 apresentam os resultados obtidos de teor de proteína e de atividade enzimática dos precipitados e sobrenadantes obtidos a partir de adições sucessivas de sulfato de amônio. A partir dos mesmos vê-se que o maior teor de proteínas e a maior atividade de tirosinase foram obtidos no

precipitado obtido após adição de 60% (m/v) de sulfato de amônio (Ppt3). A concentração de proteínas foi decrescendo gradativamente nos sobrenadantes, já que, a cada adição de sulfato de amônio, proteínas com diferentes pontos isoelétricos foram sendo precipitadas pelo processo de *salting out*. O mesmo comportamento aconteceu com relação à atividade enzimática, que caiu gradativamente à medida que novas adições de sal foram realizadas, sendo mais significativo para o Sob3.

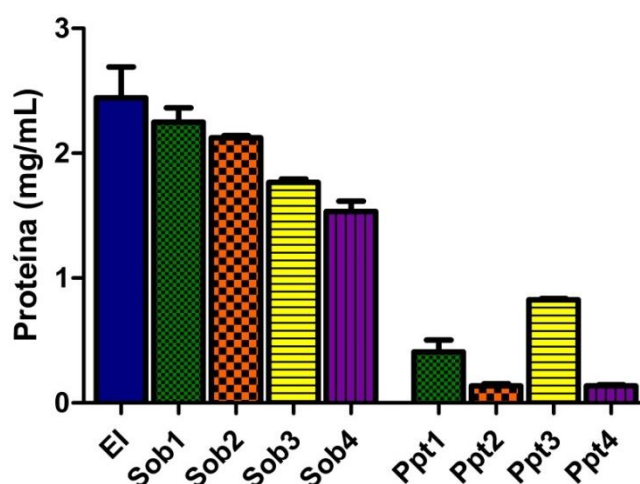


FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NOS PRECIPITADOS (Ppt) E NOS SOBRENADANTES (Sob) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE SULFATO DE AMÔNIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO INICIAL (EI)

NOTA: Sob1 e Ppt1 – obtidos após adição de 20% (m/v) de sal; Sob2 e Ppt2 – obtidos após adição de 40% (m/v) de sal; Sob3 e Ppt 3 – obtidos após adição de 60% (m/v) de sal; Sob4 e Ppt4 – obtidos após adição de 80% (m/v) de sal.

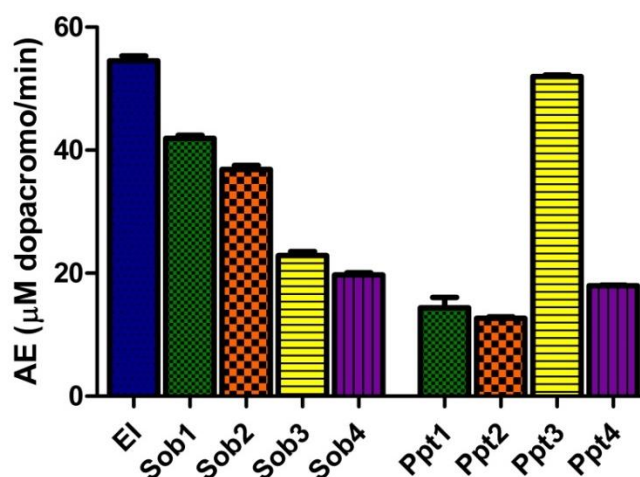


FIGURA 19 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DOS PRECIPITADOS (Ppt) E DOS SOBRENADANTES (Sob) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE SULFATO DE AMÔNIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO INICIAL (EI)

NOTA: Sob1 e Ppt1 – obtidos após adição de 20% (m/v) de sal; Sob2 e Ppt2 – obtidos após adição de 40% (m/v) de sal; Sob3 e Ppt 3 – obtidos após adição de 60% (m/v) de sal; Sob4 e Ppt4 – obtidos após adição de 80% (m/v) de sal.

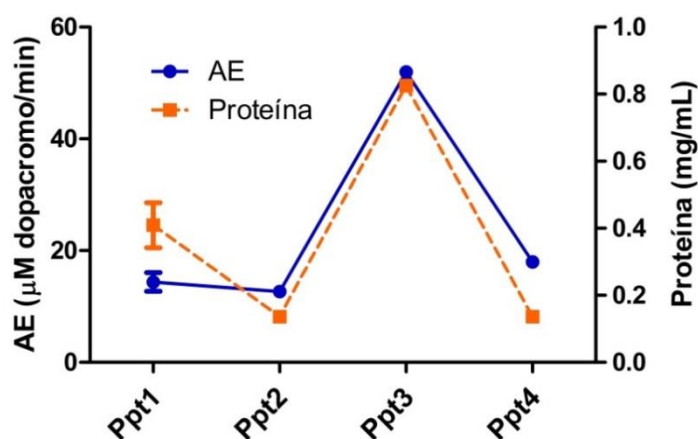


FIGURA 20 – CORRELAÇÃO ENTRE TEOR DE PROTEÍNA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DOS PRECIPITADOS (Ppt) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES SUCESSIVAS DE SULFATO DE AMÔNIO AO EXTRATO ENZIMÁTICO INICIAL

NOTA: Ppt1, 2, 3 e 4 foram obtidos após adição de 20, 40, 60 e 80% (m/v) de sal, respectivamente.

A tabela de purificação (Tabela 3) apresenta que a recuperação da atividade no Ppt3 foi de aproximadamente 95% com relação à atividade do extrato enzimático inicial. Ou seja, quase a totalidade da atividade inicial foi recuperada nesta etapa de precipitação. Por outro lado, a atividade enzimática específica do Ppt3 foi mais baixa que a do Ppt2 e do Ppt4, mas isso se deve principalmente ao baixo teor de proteínas dos precipitados 2 e 4, que faz com que a atividade específica aumente. Além disso, a recuperação da atividade enzimática para o Ppt2 e para o Ppt4 foi de apenas 23 e 33%, respectivamente. Como o objetivo do trabalho é a obtenção de alta quantidade de tirosinase, com alta taxa de atividade enzimática e com grau de pureza moderado, o Ppt3 obtido através de precipitação com 60% (m/v) de sal foi o escolhido como fonte de tirosinase para os experimentos de imobilização enzimática. Precipitação prévia do extrato enzimático de PA com 40% (m/v) de sulfato de amônio foi considerada para remoção de proteínas contaminantes.

TABELA 3 – TABELA DE PURIFICAÇÃO PARA A ETAPA DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *Agaricus bisporus* COM SULFATO DE AMÔNIO

	Volume (mL)	Proteína total (mg)	AE (μM/min)	AE específica (μM/min/mg pt)	Taxa de purificação	Recuperação da AE (%)
EI	70	171,13	54,54	11,20	1	100
Ppt1	10	4,09	14,40	18,42	1,64	26,40
Ppt2	10	1,37	12,66	46,65	4,17	23,21
Ppt3	10	8,26	52,00	31,49	2,81	95,35
Ppt4	10	1,37	18,00	66,11	5,90	33,00

NOTA: EI – extrato enzimático inicial; Ppt1 – precipitado com 20% (m/v) de sulfato de amônio; Ppt2 – precipitado com 40% (m/v) de sulfato de amônio; Ppt3 – precipitado com 60% (m/v) de sulfato de amônio; Ppt4 – precipitado com 80% (m/v) de sulfato de amônio.

Cromatografia em coluna de dietilaminoetil (DEAE)-Sephadex para maior purificação da tirosinase do precipitado obtido com 60% (m/v) de sulfato de amônio também foi testada. Porém, apesar de ser um método eficiente na obtenção de proteínas com elevado índice de pureza, o rendimento final foi muito baixo. A enzima foi bastante diluída durante o processo, tendo que ser submetida à liofilização posterior, o que reduziu o rendimento e a atividade enzimática recuperada. Além disso, esta técnica despende alto tempo, não sendo rápida para reprodução. Como para o objetivo do trabalho é necessário um método com alto rendimento e recuperação da atividade enzimática, e ainda fácil de ser reproduzido para rápida obtenção da enzima, esta técnica não foi adequada. Com isso, decidiu-se utilizar nos experimentos de imobilização o precipitado rico em tirosinase obtido com 60% (m/v) de sulfato de amônio, sem purificação posterior. Outros autores de trabalhos de imobilização da tirosinase já utilizaram a enzima neste mesmo nível de pureza (Ensuncho et al., 2005; Labus et al., 2011). O rendimento obtido foi de aproximadamente 12 mg proteína/g PA/ 20 g *A. bisporus*.

#### 4.3.3 Atividade enzimática na presença de DTE, EDTA, EGTA E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Neste experimento, o comportamento da tirosinase na presença de agentes redutores, quelantes e oxidantes foi avaliada, tanto numa solução enzimática impura (SE) como numa solução de tirosinase enriquecida (ST). As figuras 21 e 22 mostram os resultados obtidos.

O DTE, em ambas as concentrações testadas, foi capaz de inibir drasticamente a atividade de tirosinase, tanto na SE como na ST. Esta ação se deve ao fato do DTE ser um agente redutor, atuando na redução das formas enzimáticas E<sub>OX</sub> e E<sub>M</sub> para a forma inativa E<sub>D</sub>, com consequente inibição da oxidação enzimática da L-DOPA.

O EDTA e o EGTA são ambos agentes quelantes, com propriedades e estruturas bastante semelhantes, mas com algumas diferenças com relação a afinidade por alguns metais. O EGTA, por exemplo, possui afinidade mais alta pelos íons Ca<sup>2+</sup> e mais baixa pelos íons Mg<sup>2+</sup> que o EDTA (Interchim, 2012). Segundo a literatura, o *A. bisporus* seco possui em sua composição 0,59% (m/m ou mg/g) de Cu, 1,08% (m/m) de Fe, 0,99% (m/m) de Zn, 0,09% (m/m) de Mn, 5,04% (m/m) de

Ca, 8,17% (m/m) de Mg, 298,49% (m/m) de K, 18,28% (m/m) de Na e 115,25% (m/m) de P (Helm et al., 2009). Pelo fato da SE ainda se apresentar na forma não purificada, possui vários desses elementos químicos em sua composição, o que não ocorre na ST.

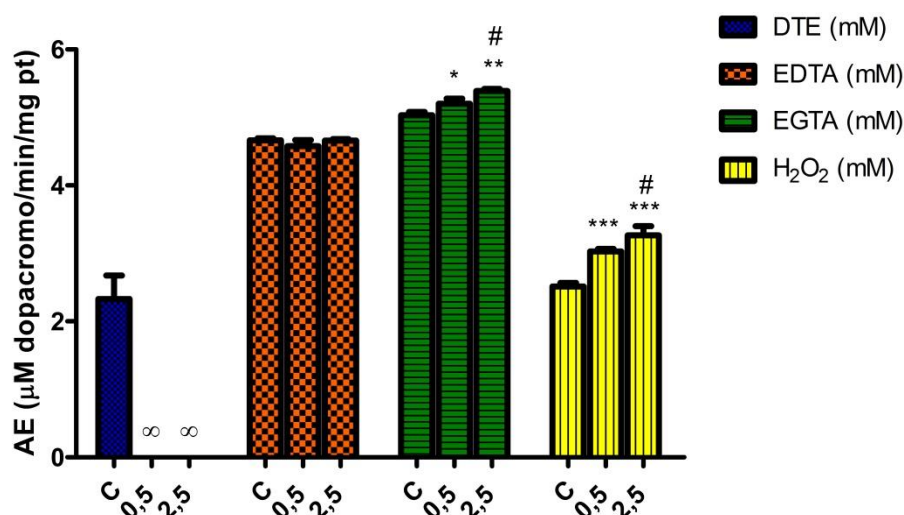


FIGURA 21 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE UMA SOLUÇÃO DE TIROSINASE IMPURA (SE) NA PRESENÇA DE DTE, EDTA, EGTA E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

NOTA:  $\infty p < 0,0001$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,0005$ ; \*\*\*  $p < 0,0002$  comparado ao controle (C). #  $p < 0,05$  comparado ao teste na concentração de 0,5 mM.

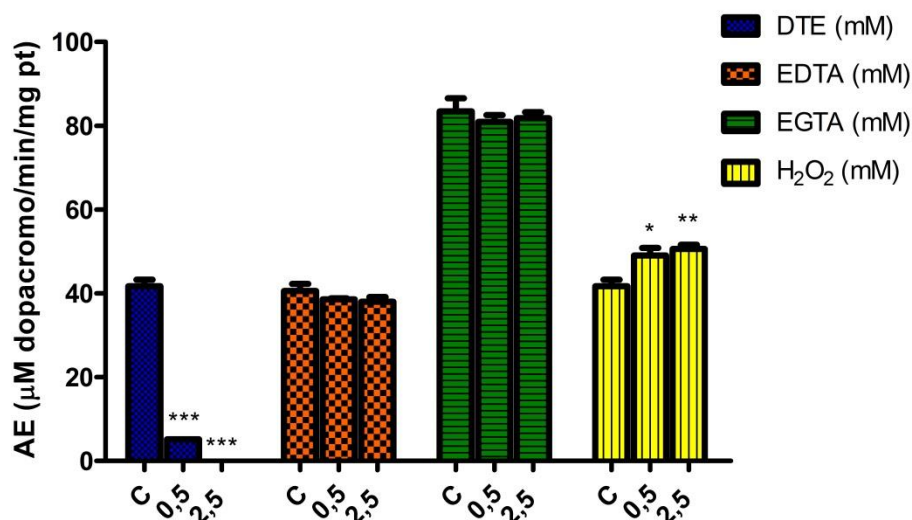


FIGURA 22 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE UMA SOLUÇÃO DE TIROSINASE ENRIQUECIDA (ST) NA PRESENÇA DE DTE, EDTA, EGTA E H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

NOTA: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$  comparado ao controle (C).

Observando os gráficos de resultados, vê-se que o EDTA não foi capaz de alterar a atividade enzimática da SE. Já o EGTA, em ambas as concentrações



testadas, aumentou pouco mas significativamente a atividade de tirosinase da mesma. Esses resultados podem ser decorrentes da ação quelante mais efetiva do EGTA sobre elementos químicos presentes na SE, os quais de alguma forma prejudicam a atividade enzimática. Por outro lado, nenhuma das duas substâncias foi capaz de alterar a atividade enzimática da ST, já que trata-se da tirosinase livre de todos os possíveis interferentes passíveis de ser quelados pelo EDTA e/ou pelo EGTA.

Alguns autores relatam o EDTA como um inibidor da tirosinase, já que este pode atuar quelando os íons cobre presentes no sítio ativo da enzima (Kong et al., 2000; Wan et al., 2009). Porém, essa ação inibitória não foi verificada nos experimentos realizados.

O  $H_2O_2$ , em ambas as concentrações testadas, foi capaz de aumentar a atividade enzimática da tirosinase, tanto na SE como na ST. Isto porque o  $H_2O_2$  atua oxidando a forma inativa  $E_D$  da tirosinase para a forma mais ativa  $E_{OX}$ , aumentando, assim, a atividade enzimática (García-Molina et al., 2005). Concentrações mais altas de  $H_2O_2$  também foram testadas na ST a fim de verificar se a atividade da tirosinase poderia ser aumentada ainda mais (Figura 23).

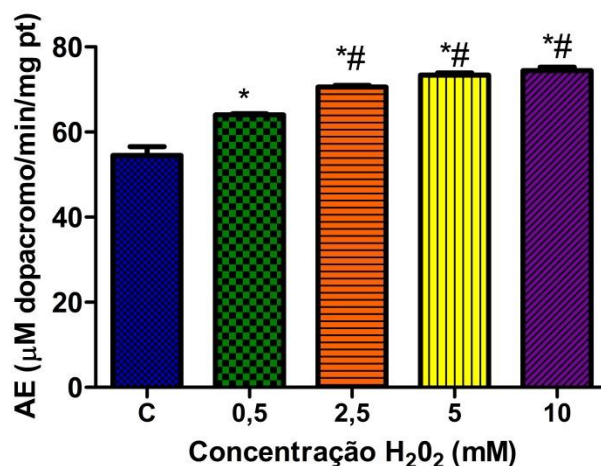


FIGURA 23 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DE UMA SOLUÇÃO DE TIROSINASE ENRIQUECIDA (ST) NA PRESENÇA DE  $H_2O_2$

NOTA: \* $p < 0,0001$  comparado ao controle (C), # $p < 0,0001$  comparado à concentração teste 0,5 mM.

O gráfico da figura 23 mostra que todas as concentrações de peróxido testadas aumentaram significativamente a atividade da ST com relação ao controle. As concentrações 2,5, 5 e 10 mM de  $H_2O_2$  aumentaram a atividade enzimática em



aproximadamente 30%, aumento maior do que o exercido pela concentração de 0,5 mM. Porém, as concentrações 5 e 10 mM de  $H_2O_2$  não induziram aumento maior da atividade do que a concentração 2,5 mM, provavelmente por esta ser uma concentração suficiente para atuar na conversão de toda forma  $E_D$  enzimática para a forma  $E_{OX}$ .

Este resultado é útil para o principal objetivo do trabalho, já que a adição de peróxido de hidrogênio na solução de tirosinase antes da imobilização faz com que qualquer parte da enzima que esteja na forma  $E_D$  seja convertida à forma mais ativa  $E_{OX}$ . Com isso, é possível a obtenção de reatores enzimáticos mais ativos.

#### 4.3.4 Desenvolvimento dos reatores de tirosinase imobilizada

As técnicas usadas para a imobilização de enzimas são de importância crítica para o desenvolvimento de IMER eficientes. Dois métodos para a imobilização enzimática são descritos, antes do empacotamento (*in batch*) e depois do empacotamento do suporte (*in situ*) (Cardoso et al., 2009). A melhor técnica de imobilização deve ser avaliada para cada enzima, usando-se fatores de comparação como capacidade de ligação da enzima ao suporte, proteína e atividade enzimática retida durante a imobilização, e atividade catalítica do reator desenvolvido. Como descrito na revisão da literatura, vários autores relatam a imobilização *in batch* da tirosinase (Sima et al., 2011; Guazzaroni et al., 2012) e outros a imobilização *in situ* da mesma em vidro com porosidade controlada (Girelli et al., 2006; 2007a; Girelli et al., 2007b; Girelli et al., 2009). No presente trabalho, comparação entre a imobilização *in situ* e *in batch* da tirosinase em epoxisílica foi realizada. Este suporte foi escolhido por ser capaz de formar ligações covalentes estáveis com os grupos reativos da enzima. Vários artigos relatam o uso de suportes com grupamentos epoxi para a imobilização enzimática, já que possuem propriedades ideais para tal, como resistência física à compressão, facilidade de acoplamento com enzimas, biocompatibilidade e capacidade de reter as propriedades biológicas enzimáticas (Félix & Descorps, 1999; Andrisano et al., 2001; Calleri et al., 2011; Mazzini et al., 2011). No presente trabalho, duas maneiras de sintetizar a epoxisílica foram testadas, usando o método comumente empregado de refluxo (Stark & Holmberg, 1989; Félix & Descorps, 1999), e uma técnica por reação em micro-ondas (Crosfield

& Sons, 1992). Apesar de o produto final ser o mesmo e ambos os métodos apresentarem rendimentos similares de epoxisílica formada (Crosfield & Sons, 1992), apresentam diferenças significativas com relação ao tempo necessário para a síntese e à praticidade.

Seguindo as diferentes técnicas propostas para a imobilização da tirosinase, três tipos de IMER foram desenvolvidas: SR, que corresponde a imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; BR, correspondente a imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; e SM, que corresponde a imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por micro-ondas. Todos os IMER foram avaliados e comparados com relação a proteína e atividade enzimática retida durante a imobilização, capacidade de imobilização do suporte, atividade enzimática do reator, cinética e estabilidade. A figura 24 esquematiza a síntese da epoxisílica e o processo de imobilização.

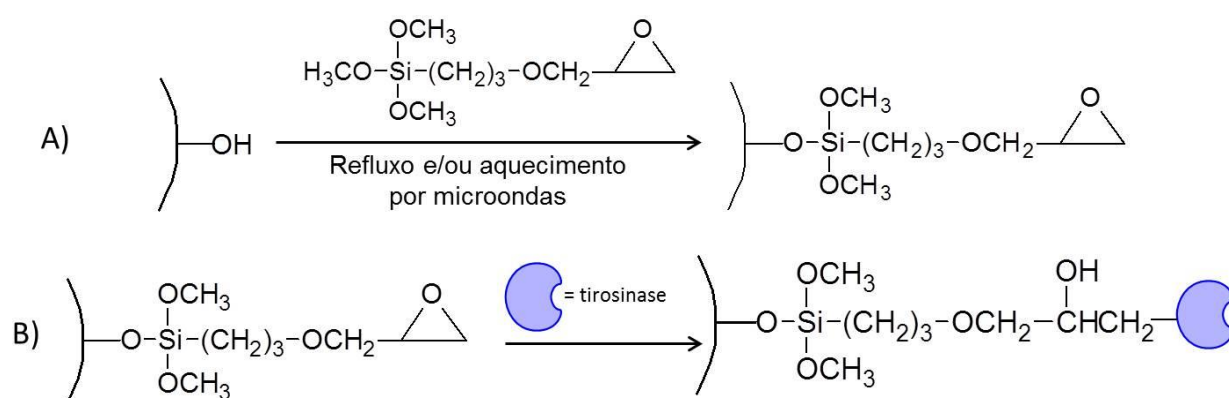


FIGURA 24 – ESQUEMA DA EPOXIDAÇÃO DA SÍLICA A PARTIR DE SUA REAÇÃO COM (3-GLICIDILOXIPROPIL)TRIMETOXISILANO (A); E DA REAÇÃO DA EPOXISÍLICA COM A TIROSINASE (B)

#### 4.3.4.1 Proteína removida pela imobilização enzimática

O processo de imobilização ocorreu por 10 h para ambas as técnicas *in batch* e *in situ*, já que após esse período de tempo a quantidade de proteína na solução enzimática permaneceu constante, caracterizando saturação do suporte com a enzima. A quantidade de proteína imobilizada final (mg proteína/g epoxisílica) para cada IMER está apresentada no gráfico da figura 25.

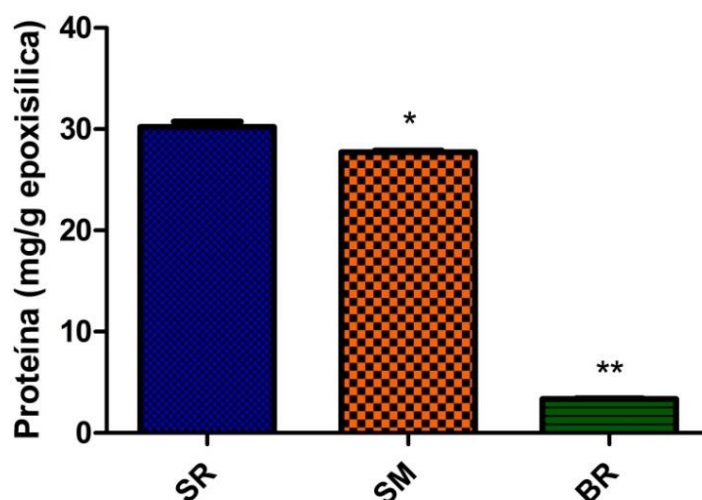


FIGURA 25 – PROTEÍNA RETIDA DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE EM EPOXISÍLICA  
 NOTA: SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisilica sintetizada por refluxo; SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisilica sintetizada por micro-ondas; BR – imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisilica sintetizada por refluxo. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3; \* $p$ <0,001 comparado ao SR, \*\* $p$ <0,0001 comparado ao SR e ao SM).

O teor de proteína foi determinado pelo método de Waddell (Waddell, 1956) a partir de uma curva de calibração de BSA (Figura 26), que apresentou coeficiente de correlação de 0,9998 e equação da reta  $y=0,6351x+0,007927$ .

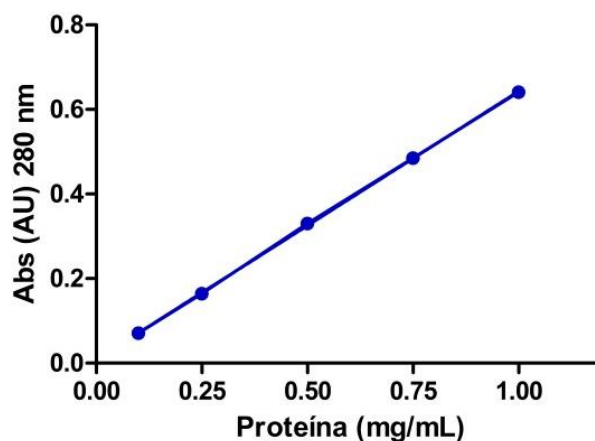


FIGURA 26 – CURVA PADRÃO DE BSA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WADDELL

Os resultados apresentados na figura 25 mostram que os dois IMER desenvolvidos pela técnica *in situ* de imobilização da tirosinase apresentaram os maiores resultados para quantidade de proteína imobilizada. Esses IMER apresentaram valores de proteína retida quase 10 vezes maiores do que para o

IMER desenvolvido pela técnica *in batch*, e a imobilização da tirosinase na coluna pré-empacotada (método *in situ*) conduziu a uma melhor capacidade de ligação da epoxisílica à proteína. Isto pode ser decorrente da pressão operacional dentro da coluna durante a imobilização *in situ*, e ainda da maior área superficial de contato entre a enzima e o suporte comparado ao método *in batch*, o que colabora para a formação da ligação covalente entre a enzima e o grupo epoxi do suporte. Na técnica *in batch*, como a enzima e o suporte estão dispersos no tampão, o contato entre os grupos reativos de ambos é menor comparado ao método *in situ*. E, ainda, o fato do suporte permanecer suspenso em tampão aquoso no método *in batch* pode facilitar a abertura do anel epoxi, prejudicando também o rendimento da imobilização.

Apesar de significativamente diferentes, os valores de proteína retida para os reatores SR e SM foram bastante próximos, o que significa que a imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo ou por micro-ondas conduz a resultados similares com relação à retenção de proteína.

#### 4.3.4.2 Atividade enzimática removida pela imobilização enzimática

A atividade enzimática retida ( $\mu\text{M}$  dopacromo/min/g epoxisílica) da solução de tirosinase para cada IMER em consequência da imobilização enzimática está apresentada no gráfico da figura 27.

Os resultados obtidos para os IMER SR e SM foram bastante similares, apesar do SR ter apresentado valores significativamente maiores. O IMER BR apresentou a menor retenção de atividade enzimática e capacidade de remoção de atividade pelo suporte, com valores cerca de quatro vezes menores que para o IMER SR. Estes resultados estão de acordo com os de proteína retida apresentados, já que quanto melhor a capacidade de retenção de proteína, maior a remoção de atividade enzimática durante a imobilização. Com isso, é possível assumir que a técnica *in situ* de imobilização da tirosinase em epoxisílica proporciona melhores condições do que a técnica *in batch* para a retenção da atividade enzimática em consequência da ligação da proteína ao suporte. Além disso, ambas as imobilizações em epoxisílica sintetizada por refluxo e por micro-

ondas conduziram a resultados semelhantes de retenção de atividade e proteína, podendo efetivamente ser aplicadas para a imobilização da tirosinase.

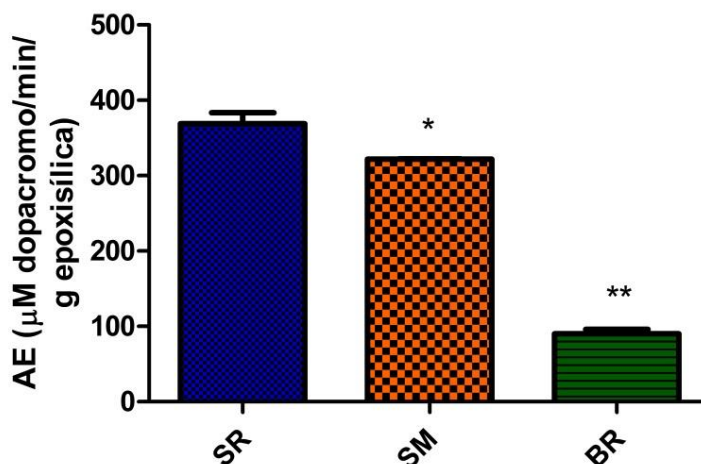


FIGURA 27 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) RETIDA DURANTE A IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE

NOTA: SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisilica sintetizada por refluxo; SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisilica sintetizada por micro-ondas; BR – imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisilica sintetizada por refluxo. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3; \* $p < 0,001$  comparado ao SR, \*\* $p < 0,0001$  comparado ao SR e ao SM).

#### 4.3.4.3 Atividade e cinética dos reatores enzimáticos

Após injeção de L-DOPA 2 mM nas colunas SR, SM e BR foi possível caracterizar o pico de dopacromo através de seu perfil espectral característico com um máximo em 475 nm. Isso significa que os IMER foram capazes de catalisar a oxidação da L-DOPA a dopacromo, concluindo que a imobilização covalente da tirosinase em epoxisilica reteve a atividade enzimática. Para todas as colunas o tempo de retenção do dopacromo apresentou-se próximo a 2,1 min (Figura 28). Algumas diferenças na resolução e na simetria do pico, causadas principalmente pelo empacotamento manual das colunas, foram observadas entre os diferentes reatores. Somente o pico do dopacromo foi detectado nos cromatogramas em todos os comprimentos de onda, o que significa que a conversão enzimática da L-DOPA a dopacromo no interior das colunas foi total para a concentração testada de substrato.

A partir de uma curva de calibração de dopacromo (Figura 29), apresentando coeficiente de correlação de 0,9990 e equação da reta  $y = 7062x + 72,70$ , foi possível calcular a atividade enzimática inicial (μM dopacromo/min) dos

IMER. Os valores encontrados para as colunas SR, SM e BR foram, respectivamente,  $487,53 \pm 24,65$ ,  $517,19 \pm 14,62$  e  $437,60 \pm 16,59$   $\mu\text{M}/\text{min}$ .

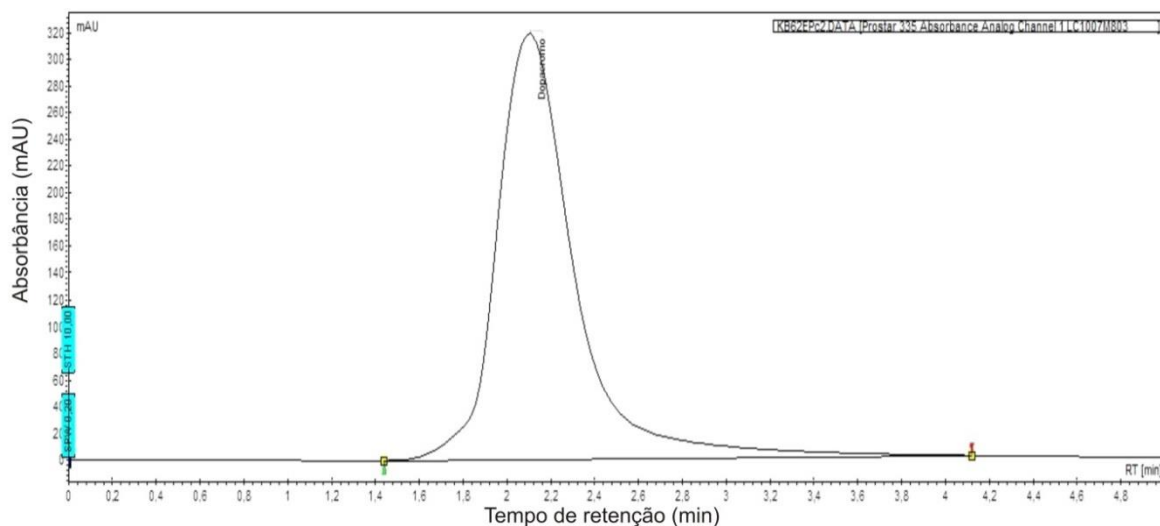


FIGURA 28 - CROMATOGRAMA APRESENTANDO O PICO DE DOPACROMO OBTIDO APÓS INJEÇÃO DE L-DOPA NO REATOR DE TIROSINASE

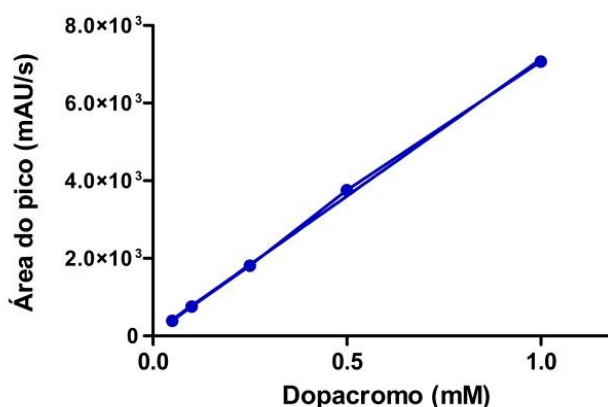


FIGURA 29 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE DOPACROMO

A análise estatística dos resultados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey mostrou que os valores de atividade inicial para as colunas enzimáticas SR e SM foram significativamente iguais e maiores que o apresentado pela coluna BR. Desta forma, pode-se afirmar que a imobilização *in situ* da tirosinase, tanto em epoxissílica sintetizada por refluxo como por micro-ondas, é capaz de produzir colunas mais ativas que a imobilização *in batch*. Este resultado está de acordo com os apresentados anteriormente, já que os IMER com maior capacidade de retenção de proteína e atividade durante a imobilização, SR e SM, foram os reatores que apresentaram melhor capacidade catalítica.

Para determinar os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  dos IMER, a atividade da enzima imobilizada para concentrações crescentes de L-DOPA foi plotada num gráfico e análise dos dados por regressão não-linear foi realizada. Como pode ser visualizado na figura 30-A, a concentração de dopacromo produzida dependeu da concentração de L-DOPA injetada nos IMER, seguindo a equação de Michaelis-Menten, mesmo comportamento apresentado pela enzima livre (Figura 30-B).

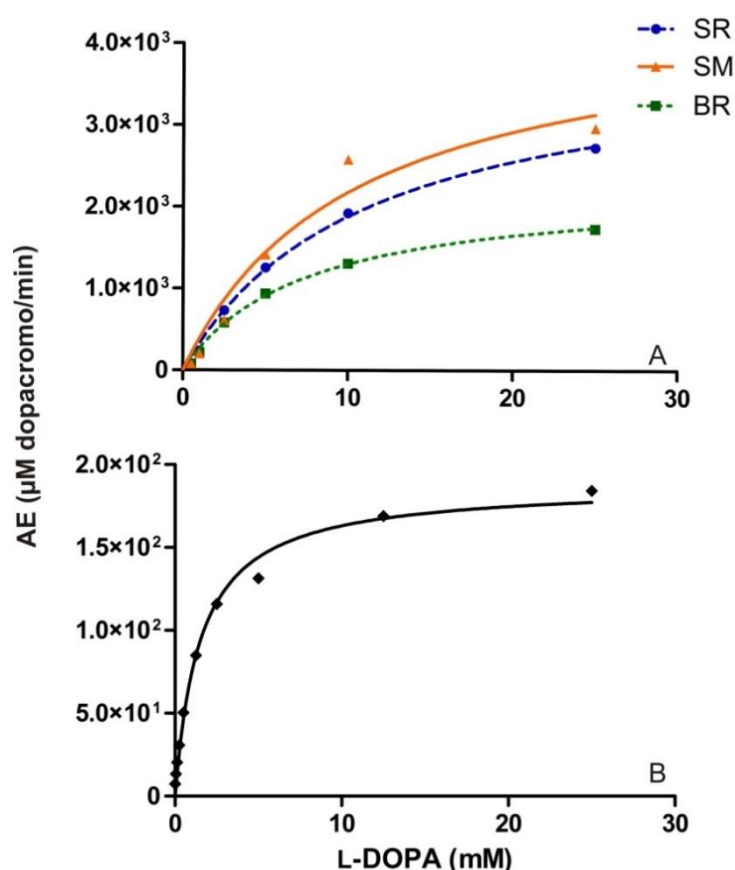


FIGURA 30 – GRÁFICO MICHAELIS-MENTEN DA TIROSINASE IMOBILIZADA (A) E LIVRE (B)  
 NOTA: AE – atividade enzimática; (●) SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; (▲) SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por micro-ondas; (■) BR – imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3).

Os valores de  $K_m$  para a tirosinase nos reatores SR, SM e BR (Figura 31) não apresentaram diferença significativa entre si quando analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Isto significa que a tirosinase imobilizada possui afinidade similar pelo seu substrato em todos os reatores, e que a concentração de substrato necessária para ser atingida metade da velocidade

catalítica máxima é significativamente igual para todas as colunas (Guido et al., 2010). Por outro lado, o valor de  $K_m$  para a enzima livre foi significativamente menor quando comparado à enzima imobilizada. Valores maiores de  $K_m$  para reatores enzimáticos significam menor afinidade da enzima imobilizada pelo seu substrato comparado com a enzima livre. Esta é uma característica comum e intrínseca da imobilização enzimática, e pode ser devida a introdução de impedimento estérico pelo suporte ao sítio ativo da enzima, a falta de flexibilidade suficiente da enzima para ligação com seu substrato, ou a uma resistência difusional no transporte do substrato no interior da coluna (Mateo et al., 2007; Moaddel & Wainer, 2007; Gabrovska et al., 2008).

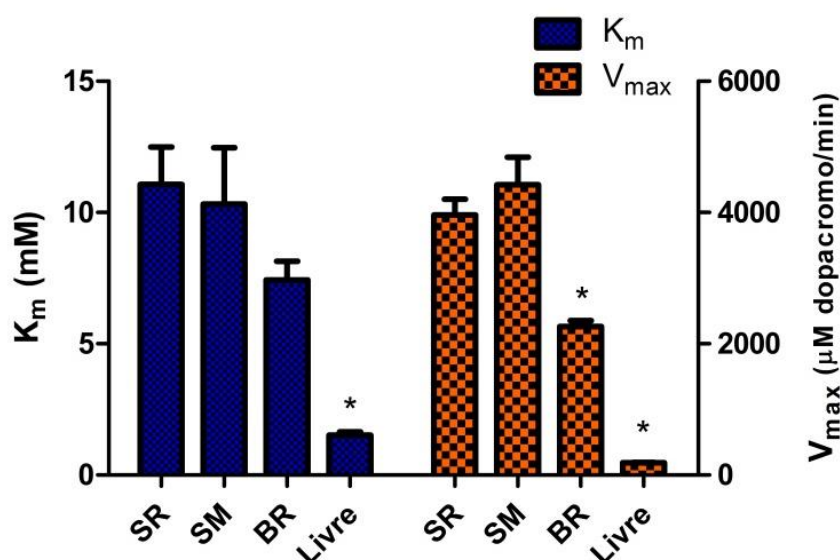


FIGURA 31 – PARÂMETROS CINÉTICOS  $K_m$  E  $V_{max}$  PARA A TIROSINASE LIVRE E IMOBILIZADA EM EPOXISÍLICA

NOTA: SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por micro-ondas; BR – imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP ( $n=3$ ; \* $p<0,0001$  comparado aos outros testes).

Os valores de  $V_{max}$  para os IMER, por sua vez, foram de pelo menos doze vezes maiores que os exibidos pela enzima livre (Figura 31). Isto pode ser atribuído a quantidade maior de enzima imobilizada nos reatores comparada a quantidade de enzima livre utilizada para os experimentos de cinética (Guido et al., 2010). Os valores de  $V_{max}$  para os IMER SR e SM não apresentaram diferenças significativas entre si. Em contraste, o reator BR apresentou  $V_{max}$  significativamente mais baixo que os outros IMER, mostrando que a imobilização *in situ* da tirosinase em



epoxisílica conduz a reatores enzimáticos de fato mais ativos que a imobilização *in batch*. Este resultado está de acordo e pode ser explicado pela maior quantidade de proteína ativa imobilizada e atividade enzimática retida durante a imobilização nas colunas SR e SM (Girelli & Mattei, 2005), já que quanto maior estes valores mais ativo é o reator obtido.

O valor de  $V_{max}$  e a atividade enzimática mais baixos para a coluna BR também podem ser explicados pela perda de atividade enzimática durante o processo de empacotamento na técnica *in batch*. Em um trabalho anterior, baseado na imobilização de penicilina G acilase em derivados de sílica, a imobilização *in batch* conduziu à perda de atividade catalítica, sugerindo que o empacotamento do suporte com a enzima previamente imobilizada poderia comprometer irreversivelmente a atividade enzimática. O processo de imobilização *in situ*, em contrapartida, evita este problema, já que a imobilização acontece após o empacotamento (Félix & Descorps, 1999; Calleri et al., 2004b).

#### 4.3.4.4 Estabilidade dos reatores de tirosinase imobilizada

Considerando que uma das características mais importantes de um reator enzimático é a longevidade, um estudo de estabilidade foi conduzido avaliando a atividade dos IMER dentro de 20 dias. Após este tempo, as colunas SR, SM e BR mantiveram  $46,57 \pm 1,19\%$ ,  $78,29 \pm 3,19\%$  e  $39,33 \pm 3,16\%$ , respectivamente, da atividade enzimática inicial (Figura 32).

A tirosinase é relatada na literatura como uma enzima instável, com retenção de sua atividade por apenas alguns dias quando armazenada em tampão a 4-8 °C, e com perda de 40 a 60% de atividade em 7 dias quando armazenada na forma sólida a temperatura ambiente. A enzima imobilizada na coluna SM foi a que melhor manteve sua atividade após 20 dias de armazenamento, mas o decréscimo da atividade enzimática dos reatores até 15 dias foi similar. A redução da atividade da enzima pode ser explicada pela inativação suicida da tirosinase, que é crítica para a obtenção de biocatalisadores estáveis. Esta inativação é causada por produtos da reação enzimática, como as o-quinonas, ou por radicais livres, subprodutos da síntese de derivados quinóicos (Ebanks et al., 2009). Estas substâncias podem atacar um grupo nucleofílico crucial ou diretamente o sítio ativo da enzima,

comprometendo sua atividade (Labus et al., 2011). Desta forma, diferenças na estabilidade de cada coluna podem ser explicadas por diferentes taxas de inativação suicida da tirosinase.

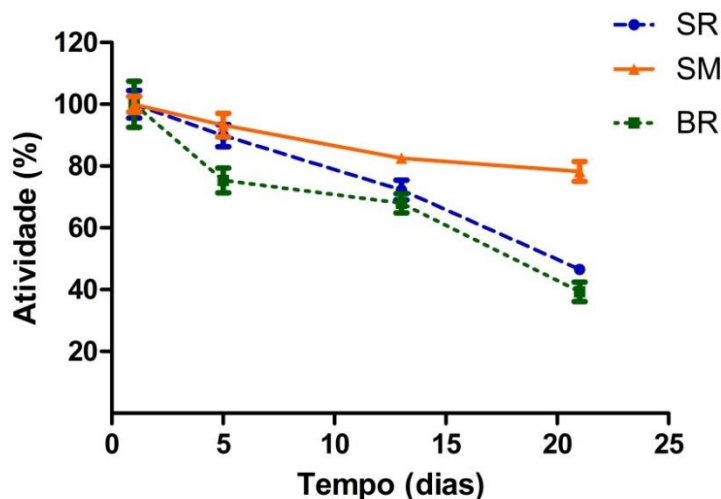


FIGURA 32 - ESTABILIDADE DOS IMER ARMAZENADOS A 4 °C EM TAMPÃO FOSFATO 15 mM pH 7,0 CONTENDO 0,01% DE AZIDA SÓDICA

NOTA: (●) SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; (▲) SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por micro-ondas; (■) BR – imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3).

Apesar dos reatores terem perdido atividade com o tempo, todos se mantiveram ativos após 20 dias e puderam ser considerados para suas aplicações. Isto porque todos os estudos subsequentes com os reatores enzimáticos foram comparativos e conduzidos com controle da atividade enzimática.

#### 4.3.4.5 Comparação dos métodos de imobilização da tirosinase em epoxisílica

A tabela 4 apresenta os resultados de imobilização obtidos para as colunas SR, SM e BR. Considerando esses dados e a discussão prévia dos resultados é possível afirmar que a imobilização enzimática antes do empacotamento (*in batch*) foi o método menos eficiente para a imobilização da tirosinase e para o desenvolvimento de reatores enzimáticos ativos. O método *in situ* foi então o escolhido para a imobilização da tirosinase nos experimentos seguintes realizados.

Além disso, os dados obtidos para as colunas SR e SM foram bastante similares, o que significa que a imobilização *in situ* em epoxisílica sintetizada por

refluxo ou por micro-ondas gera reatores de atividade similar. Como a síntese da epoxisílica por micro-ondas é mais rápida e fácil de ser reproduzida do que por refluxo, este método foi o de escolha para a síntese de epoxisílica para o desenvolvimento de IMER de tirosinase.

TABELA 4 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE EM EPOXISÍLICA POR DIFERENTES MÉTODOS

	SR	SM	BR
Proteína imobilizada (mg/ g epoxisílica)	30,23 ± 0,51	27,71 ± 0,16	3,34 ± 0,07
AE imobilizada (μM dopacromo/ min/g epoxisílica)	369,09 ± 14,53	321,68 ± 0,71	90,40 ± 5,48
K <sub>m</sub> (mM)	11,07 ± 1,42	10,32 ± 2,15	7,43 ± 0,72
V <sub>max</sub> (μM dopacromo/min)	3963 ± 237,20	4421 ± 420,60	2261 ± 90,58
Estabilidade 20 dias (% atividade inicial)	46,57 ± 1,19	78,29 ± 3,19	39,33 ± 3,16

NOTA: SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por micro-ondas; BR – imobilização *in batch* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por refluxo; AE – atividade enzimática. Os resultados estão expressos como a média ± DP (n=3).

A reprodução da imobilização *in situ* da tirosinase em epoxisílica sintetizada por micro-ondas comprovou a reprodutibilidade do método (95,43 ± 0,77 %), sendo este satisfatório para o desenvolvimento de IMER de tirosinase eficientes para aplicação na triagem de inibidores.

Este é o primeiro estudo comparativo da imobilização da tirosinase neste tipo de suporte cromatográfico. Além disso, nenhum relato na literatura foi encontrado para a imobilização da tirosinase em epoxisílica, e para a imobilização enzimática em epoxisílica sintetizada por micro-ondas em geral.

#### 4.3.5 Aplicação do reator de tirosinase imobilizada

Diversas aplicações dos IMER foram citadas anteriormente neste trabalho, e muitas delas poderiam ser exploradas com o IMER de tirosinase. Este trabalho teve como foco a aplicação do reator de tirosinase para a triagem de inibidores enzimáticos, já que a descoberta de novos agentes com atividade anti-hiperpigmentação é oportuna, e métodos mais eficientes, reprodutíveis e de alta tecnologia se fazem necessário.

Para tanto, a sensibilidade do reator de tirosinase frente a solventes orgânicos injetados juntamente às amostras a serem testadas foi primeiramente avaliada. Em seguida, a validação do método para a triagem eficiente de inibidores foi realizada com o inibidor padrão ácido kójico. Fez-se análise do comportamento e dos parâmetros bioquímicos da enzima imobilizada na presença deste inibidor conhecido, para confirmar a utilização do método de forma confiável na determinação de inibidores potenciais. Por último, substâncias de diversas classes químicas, inclusive derivados inéditos obtidos por biotransformação e síntese química, foram testadas com relação ao seu potencial inibidor no IMER de tirosinase.

#### 4.3.5.1 Sensibilidade do reator enzimático a solventes orgânicos

Estudou-se o efeito dos solventes metanol, acetonitrila e DMSO na atividade do reator enzimático SM, para posterior aplicação dos mesmos na solubilização das substâncias a serem testadas como inibidores da tirosinase. O conhecimento da influência dos solventes na atividade do reator é importante, principalmente para controle da inativação da enzima imobilizada durante a triagem de inibidores enzimáticos. Os gráficos da figura 33 apresentam os resultados obtidos.

Um aspecto importante dos estudos enzimáticos em meio contendo solvente orgânico é que a quantidade de água associada à enzima é determinante para a atividade, estabilidade e especificidade catalítica. A água é necessária para aquisição e manutenção da enzima numa conformação cataliticamente ativa. Num meio contendo água e solvente orgânico, a água é particionada entre a enzima e o solvente, e desde que uma pequena quantidade de água esteja associada à enzima, está manterá sua atividade em meio orgânico (Koskinen & Klibanov, 1996). A partir dos resultados obtidos (Figura 33) é possível verificar que de fato o reator de tirosinase imobilizada se manteve ativo na presença de diferentes proporções de solventes orgânicos em meio aquoso. Porém, a atividade foi reduzida de forma dependente desta proporção e da natureza do solvente.

Para todos os solventes testados a atividade da enzima imobilizada foi reduzida com o aumento do teor orgânico, sendo esta redução significativa para concentrações maiores ou iguais que 20, 10 e 15% (v/v) de metanol, acetonitrila e

DMSO, respectivamente. A natureza hidrofílica dos solventes testados também foi determinante para a redução da atividade do IMER. Sabe-se que a natureza do solvente orgânico afeta direta e indiretamente a atividade e estabilidade enzimática, assim como a especificidade pelo substrato, a enantioseletividade, a regioseletividade e a quimioseletividade. Solventes relativamente hidrofílicos, como os testados no reator de tirosinase imobilizada, são capazes de retirar a água essencial da superfície enzimática, levando a uma hidratação insuficiente da enzima e a uma redução da atividade da mesma (Koskinen & Klibanov, 1996).

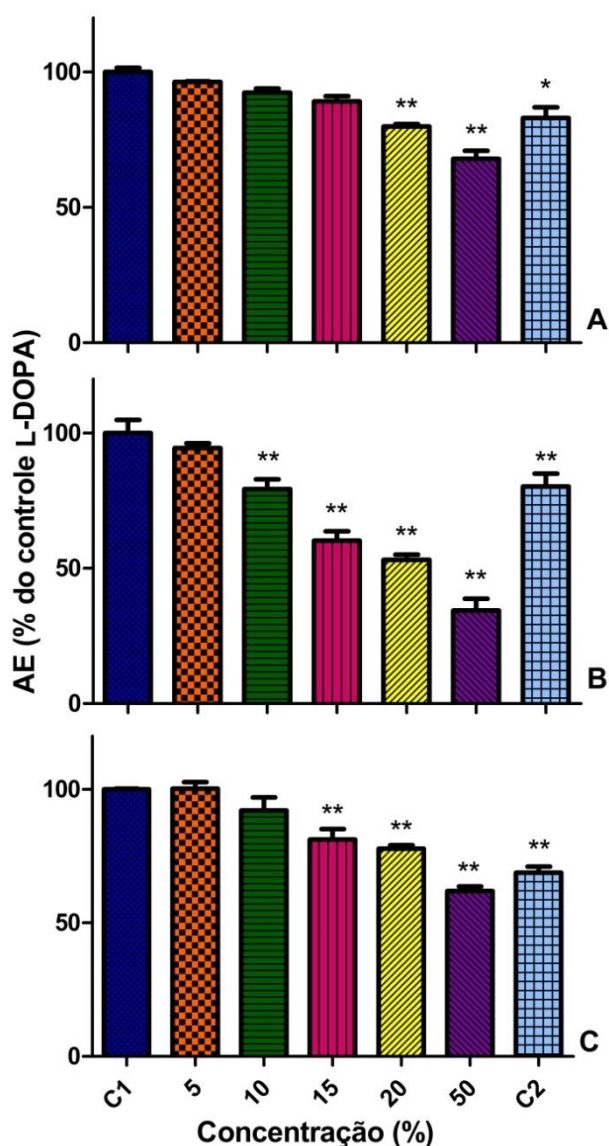


FIGURA 33 - INFLUÊNCIA DE METANOL (A), ACETONITRILA (B) E DIMETILSULFÓXIDO (C) NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA (AE) DA TIROSINASE IMOBILIZADA

NOTA: C1 – atividade enzimática inicial do reator (controle) antes dos testes com solvente; C2 – atividade enzimática final do reator após testes com solvente. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3; \* $p$ <0,001, \*\* $p$ <0,0001 comparado ao C1).

Outro fator determinante para a atividade enzimática em meio orgânico é a polaridade do solvente orgânico e a capacidade de solvatação do substrato. Sabe-se que a especificidade enzimática por seu substrato é afetada pelo meio reacional, e pode ser alterada substancialmente pela presença de solventes orgânicos, que determinam uma diferente solvatação do substrato no meio (Janssen & Halling, 1994). Com isso, a redução da atividade do reator de tirosinase pelos solventes está também relacionada à redução da solvatação do substrato L-DOPA. A partir dos resultados observa-se que metanol, um solvente bastante polar e prótico, causou menor redução da atividade do IMER e somente em concentrações maiores que 20% (v/v), em consequência de melhor solvatação da L-DOPA comparado à acetonitrila. Esta, por sua vez, provocou decréscimo na atividade a partir de 10% (v/v) no meio, e reduziu a atividade em aproximadamente 50% quando na concentração de 20% (v/v) no meio reacional, caracterizando menor solvatação do substrato.

Além disso, o solvente pode afetar a atividade e a especificidade enzimática alterando a partição do substrato e dos produtos entre a fase orgânica e a fase aquosa ao redor do sítio ativo. Para a reação enzimática ocorrer, parte do substrato distribuído na fase orgânica deverá ser particionado para a fração aquosa ao redor do sítio ativo para formar o complexo enzima-substrato, e o produto formado no meio aquoso também deve ser particionado para a fase orgânica para dar espaço a uma nova catálise enzimática. Com isso, a velocidade da reação enzimática e os parâmetros cinéticos são alterados na presença de solventes orgânicos (Koskinen & Klibanov, 1996). Este fato explica em parte os resultados obtidos para o DMSO. Este é um solvente hidrofílico polar capaz de solvatar a L-DOPA, mas que apresenta alta viscosidade, a qual é limitante para o fenômeno de partição. A partição mais lenta do substrato e dos produtos entre a fase aquosa e orgânica reduz então a velocidade da reação enzimática, diminuindo, consequentemente, a atividade do reator.

O dano causado pelos solventes à estrutura enzimática foi determinado através da injeção de solução de L-DOPA, na ausência de solventes, antes e após os testes. Este dano foi determinado como a redução da quantidade de enzima ativa imobilizada, que foi de  $16,90 \pm 3,84$ ,  $19,79 \pm 4,88$  e  $31,11 \pm 2,29\%$  para metanol, acetonitrila e DMSO, respectivamente. Esta inativação ou desnaturação da enzima imobilizada pode ser devido à alteração do movimento dinâmico e da conformação proteica pelos solventes, assim como à redução do número de sítios ativos, o que

prejudica diretamente a atividade enzimática (Koskinen & Klibanov, 1996). Metanol foi o menos danoso à estrutura proteica, seguido da acetonitrila e do DMSO. Este último, apesar de somente ter reduzido significativamente a atividade em concentrações maiores que a acetonitrila, foi mais prejudicial à estrutura enzimática imobilizada. Isto pode mais uma vez estar relacionado a alta viscosidade deste solvente, o que gera maior pressão e altera em maior grau o movimento dinâmico e a conformação da proteína.

Com isso, metanol, acetonitrila e DMSO podem ser usados na solubilização das amostras a serem testadas como potenciais inibidores, sem prejuízo à atividade do reator enzimático se usadas nas concentrações baixas previamente estipuladas. Contudo, se o uso de maiores teores se fizer necessário, devem ser realizados controles para as concentrações de solvente usadas, e deve ser considerada uma provável perda de enzima imobilizada ativa.

#### 4.3.5.2 Teste do reator de tirosinase imobilizada com inibidor padrão

Ácido kójico (I) foi testado como inibidor padrão da tirosinase no reator enzimático para validar a aplicação do método na triagem de inibidores e verificar se o comportamento da enzima imobilizada frente a inibidores é o mesmo apresentado pela enzima livre.

Injeções de concentrações crescentes de ácido kójico no IMER de tirosinase causaram redução cada vez maior do pico de dopacromo formado, caracterizando inibição pelo ácido kójico da oxidação da L-DOPA a dopacromo catalisada pela tirosinase imobilizada (Figura 34).

Após injeção de diferentes concentrações de ácido kójico na presença da mesma concentração de substrato nas colunas SR e SM, desenvolveu-se um gráfico log da concentração de ácido kójico *versus* porcentagem de inibição (Figura 35). Utilizando análise por regressão não-linear foi possível determinar os valores de  $CI_{50}$   $3,92 \pm 0,68$  mM na coluna SR e  $4,57 \pm 0,81$  mM na coluna SM para o ácido kójico.

O perfil de inibição para as duas colunas foi bastante similar, e a análise estatística dos dados não apresentou diferença significativa entre os valores de  $CI_{50}$  encontrados para os IMER SR e SM. Isto revela um comportamento similar da tirosinase imobilizada com relação ao inibidor no interior das colunas, o que era

esperado, já que as colunas apresentaram também mesmo comportamento com relação ao substrato natural L-DOPA.

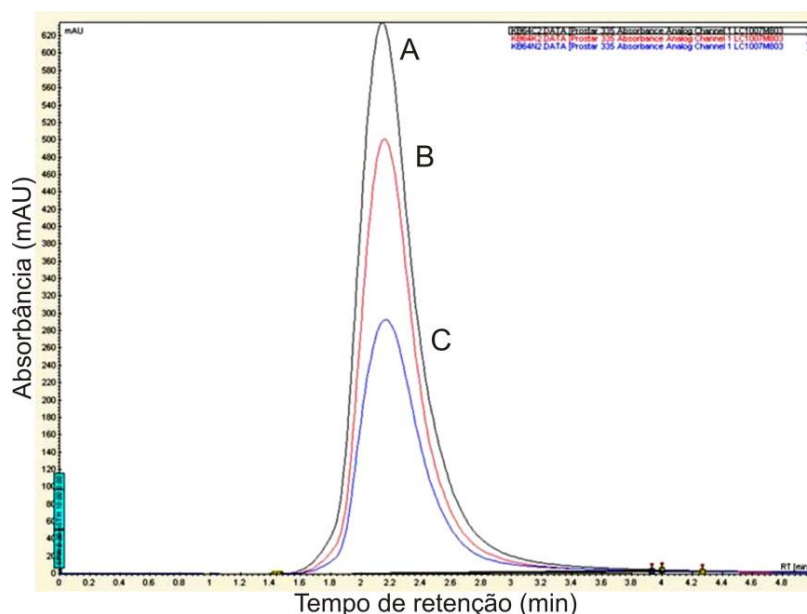


FIGURA 34 – CROMATOGRAMA APRESENTANDO PICOS DE DOPACROMO SOBREPOSTOS APÓS INJEÇÃO DE L-DOPA 10 mM (A) NA PRESENÇA DE ÁCIDO KÓJICO 1,0 (B) E 5,0 mM (C) NOTA: A – pico em preto, após injeção de L-DOPA 10 mM; B – pico em vermelho, após injeção de L-DOPA 10 mM na presença de ácido kójico 1,0 mM; C – pico em azul, após injeção de L-DOPA 10 mM na presença de ácido kójico 5,0 mM.

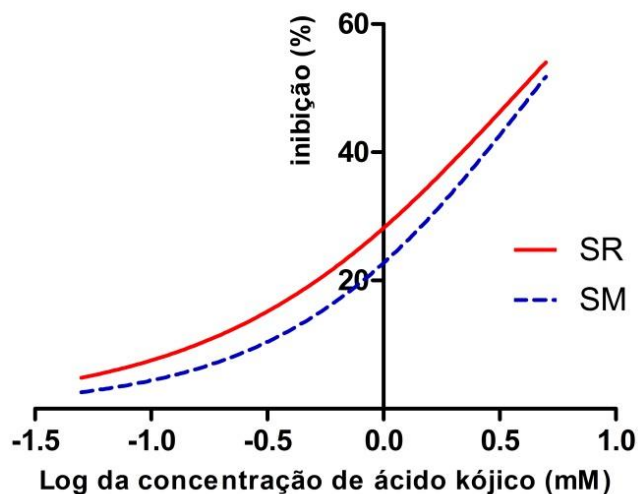


FIGURA 35 – INIBIÇÃO DA TIROSINASE IMOBILIZADA PELO ÁCIDO KÓJICO NOTA: SR – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxissílica sintetizada por refluxo; SM – imobilização *in situ* da tirosinase em epoxissílica sintetizada por micro-ondas.

Um estudo cinético foi também conduzido com o IMER SM para confirmar se o tipo de inibição causada pelo ácido kójico à enzima imobilizada é o mesmo



causado à enzima livre. Para tal, diferentes concentrações de L-DOPA foram injetadas na coluna na presença de ácido kójico 3 mM. A figura 36 mostra a curva de Michaelis-Menten obtida com os valores de atividade para cada concentração de L-DOPA na presença do inibidor. A figura 37 mostra o gráfico Lineweaver-Burk ou representação de duplo recíproco ( $1/V$  versus  $1/[S]$ , na qual  $V$  significa a velocidade da reação correspondente à atividade enzimática, e  $S$  significa a concentração do substrato). Comparação entre os gráficos cinéticos da enzima imobilizada na presença e na ausência do inibidor foi realizada.

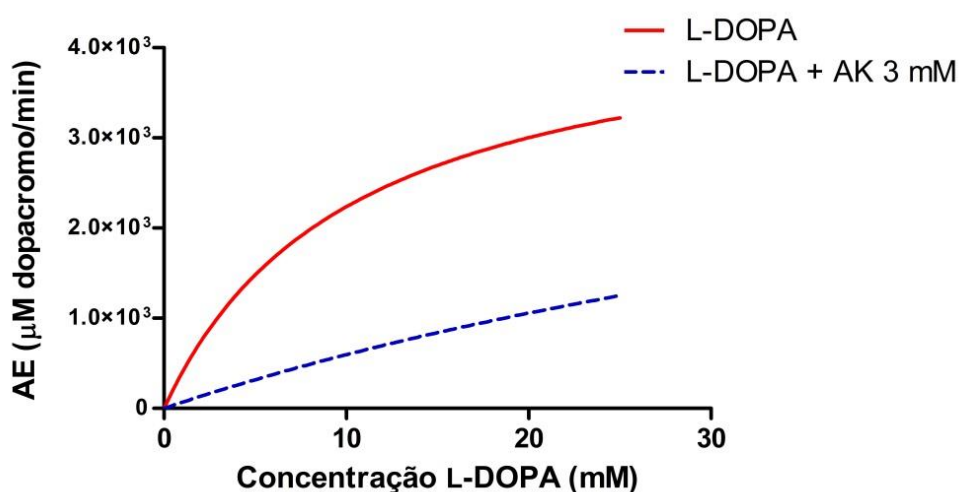


FIGURA 36 – CURVA DE MICHAELIS-MENTEN PARA A TIROSINASE IMOBILIZADA EM EPOXISÍLICA, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ÁCIDO KÓJICO (AK) 3 mM  
NOTA: AE – atividade enzimática.

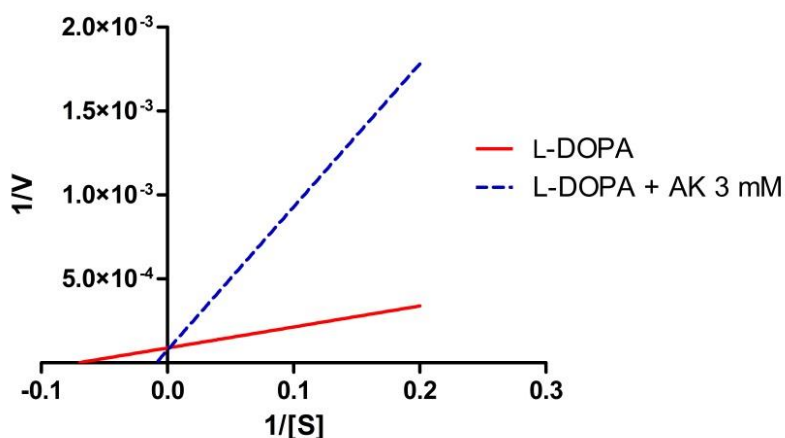


FIGURA 37 – GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK PARA A TIROSINASE IMOBILIZADA EM EPOXISÍLICA, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ÁCIDO KÓJICO (AK) 3 mM  
NOTA:  $V$  – velocidade da reação enzimática ( $\mu\text{M dopacromo/min}$ );  $[S]$  – concentração do substrato L-DOPA ( $\text{mM}$ ).

No gráfico da figura 37, observa-se um ponto comum de intersecção das retas com o eixo das ordenadas, e que as retas apresentam diferentes inclinações. O ponto de intercepção das retas com o eixo das ordenadas equivale a  $1/V_{\max}$ , e  $V_{\max}$ , neste caso, foi independente da presença do inibidor, permanecendo o mesmo na presença e na ausência de ácido kójico. Por outro lado, o ponto de intercepção entre as retas e o eixo das abscissas equivale a  $-1/K_m$ , e  $K_m$ , neste caso, dependeu da presença do inibidor, já que este parâmetro cinético na presença de ácido kójico aumentou de  $10,32 \pm 2,15$  para  $65,50 \pm 6,11$  mM. Estes resultados caracterizam inibição do tipo competitiva da tirosinase imobilizada pelo ácido kójico, já que a velocidade máxima da reação ( $V_{\max}$ ) não foi alterada na presença do inibidor, mas a concentração de substrato necessária para atingir metade desta velocidade máxima ( $K_m$ ) foi maior na presença do mesmo. Estes resultados estão de acordo com os apresentados na literatura para a enzima livre e o ácido kójico, enfatizando que a tirosinase imobilizada em epoxisílica mantém o mesmo comportamento frente a inibidores que a enzima livre (Marshall, 1991; Orio et al., 2011). Sendo assim, o reator de tirosinase imobilizada pode ser aplicado para triagem de outros potenciais inibidores enzimáticos.

#### 4.3.5.3 Aplicação do reator de tirosinase imobilizada para triagem de inibidores enzimáticos

Diferentes substâncias químicas tiveram seu potencial de inibição avaliado no IMER de tirosinase. A tabela 5 apresenta os respectivos controles usados, a classe química das substâncias, as concentrações testadas e a porcentagem (%) de inibição apresentada com relação ao controle. A figura 38 apresenta os gráficos de resultados obtidos para cada substância.

Ácido gálico (II) e ácido *p*-coumárico (III), duas substâncias fenólicas derivadas do benzoato, inibiram a tirosinase imobilizada (Figura 38-A). Este resultado está de acordo com a literatura, já que estas substâncias são relatadas como inibidores da tirosinase *in vitro*. A inibição provocada pelo ácido gálico foi mais pronunciada do que a apresentada pelo ácido *p*-coumárico. O mecanismo de ação do ácido gálico envolve a inibição da oxidação da L-DOPA catalisada pela tirosinase, por redução subsequente da dopaquinona a L-DOPA. Além disso, atua como um

substrato da tirosinase, competindo com a L-DOPA pelo sítio ativo enzimático, e sendo oxidado pela enzima (Kubo et al., 2000; Kubo et al., 2003). Ácido *p*-coumárico atua como um inibidor competitivo e não-competitivo da tirosinase, ligando-se também a outros locais da enzima que não o sítio ativo, e permitindo que o complexo enzima-inibidor-substrato ainda tenha atividade residual (Lim et al., 1999; Nguyen et al., 2012).

TABELA 5 – SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO AVALIADO NO REATOR DE TIROSINASE, SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, CLASSES QUÍMICAS, CONCENTRAÇÕES TESTADAS E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO ENCONTRADA

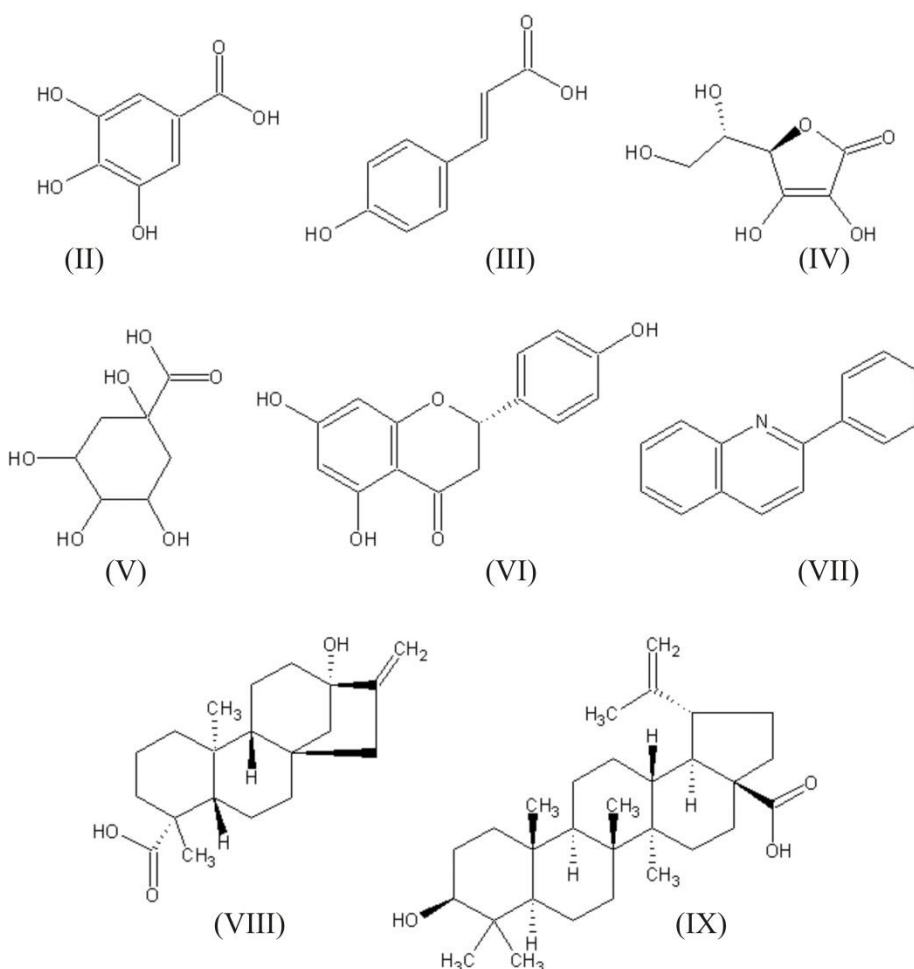
Substância	Controle (em tampão fosfato 15 mM pH 7,0)	Classe química	Concentrações testadas (mM)	% de inibição ± DP (relativo ao controle)
Ácido gálico	L-DOPA 5,0 mM, metanol 5% (v/v)	Derivado de benzoato	0,5	32,80 ± 0,97*
			2,5	45,60 ± 1,14*
Ácido <i>p</i> -coumárico	L-DOPA 5,0 mM, metanol 5% (v/v)	Derivado de benzoato	2,5	8,64 ± 2,70
			5,0	20,51 ± 5,47*
Ácido ascórbico	L-DOPA 5,0 mM	Antioxidante	1,0	63,06 ± 1,08*
			2,5	82,88 ± 1,02*
Ácido quínico	L-DOPA 5,0 mM, metanol 5% (v/v)	Ciclitol	2,5	0,81 ± 1,41
Naringenina	L-DOPA 5,0 mM, DMSO 10% (v/v)	Flavanona	1,0	0 ± 0,31
			2,5	24,12 ± 11,61*
2-Fenilquinolina	L-DOPA 5,0 mM, DMSO 50% (v/v)	Alcaloide	2,5	7,03 ± 5,67
DFQ1	L-DOPA 5,0 mM, DMSO 2,5% (v/v)	Derivado de alcaloide di-hidroxilado	2,5	26,08 ± 0,88*
DFQ2	L-DOPA 5,0 mM, DMSO 50% (v/v)	Derivado de alcaloide mono-hidroxilado	2,5	0,71 ± 1,54
Esteviol	L-DOPA 5,0 mM, DMSO 50% (v/v)	Diterpenoide	2,5	0 ± 0,20
Ácido betulínico	L-DOPA 0,5 mM, DMSO 50% (v/v)	Triterpenoide	0,25	4,62 ± 4,10
DAB1	L-DOPA 0,5 mM, DMSO 50% (v/v)	Derivado de triterpeno	0,25	3,50 ± 7,28
DAB2	L-DOPA 0,5 mM, DMSO 50% (v/v)	Derivado de triterpeno	0,25	0,49 ± 6,10

NOTA: DFQ – derivado da 2-fenilquinolina; DAB – derivado do ácido betulínico; \*resultados significativamente diferentes do controle ( $p < 0,0001$ ). Resultados estão expressos como a média ± DP (n=3).

Ácido ascórbico (IV) apresentou alta atividade inibitória do IMER de tirosinase (Figura 38-A). Na literatura, esta substância tem sua ação inibitória descrita em consequência de sua forte ação antioxidante, causando redução da

dopaquinona a L-DOPA e prevenindo a formação de dopacromo e de melanina em células (Chang, 2009).

Derivados fenólicos do ácido quínico (V), como os ácidos cafeoilquínicos, são relatados na literatura como inibidores da tirosinase (Iwai et al., 2004; Gao et al., 2008). Mas o próprio ácido quínico não inibiu a tirosinase imobilizada (Figura 38-A), e nenhum relato foi encontrado de que o mesmo possui esta ação, o que pode ser consequência da ausência de um anel fenólico em sua estrutura, diferente de seus derivados cafeoilquínicos.



A flavanona naringenina (VI) possui estrutura química base similar a quercetina, a qual é considerada um forte inibidor da tirosinase por ação competitiva e quelante de cobre do sítio ativo (Chang, 2009). Os resultados obtidos indicam que a naringenina foi capaz de inibir a tirosinase imobilizada (Figura 38-A). Esta substância pode ter ação inibitória com mecanismo de ação competitivo similar ao apresentado por outras flavanonas, como a estepogenina (Jeong et al., 2009).

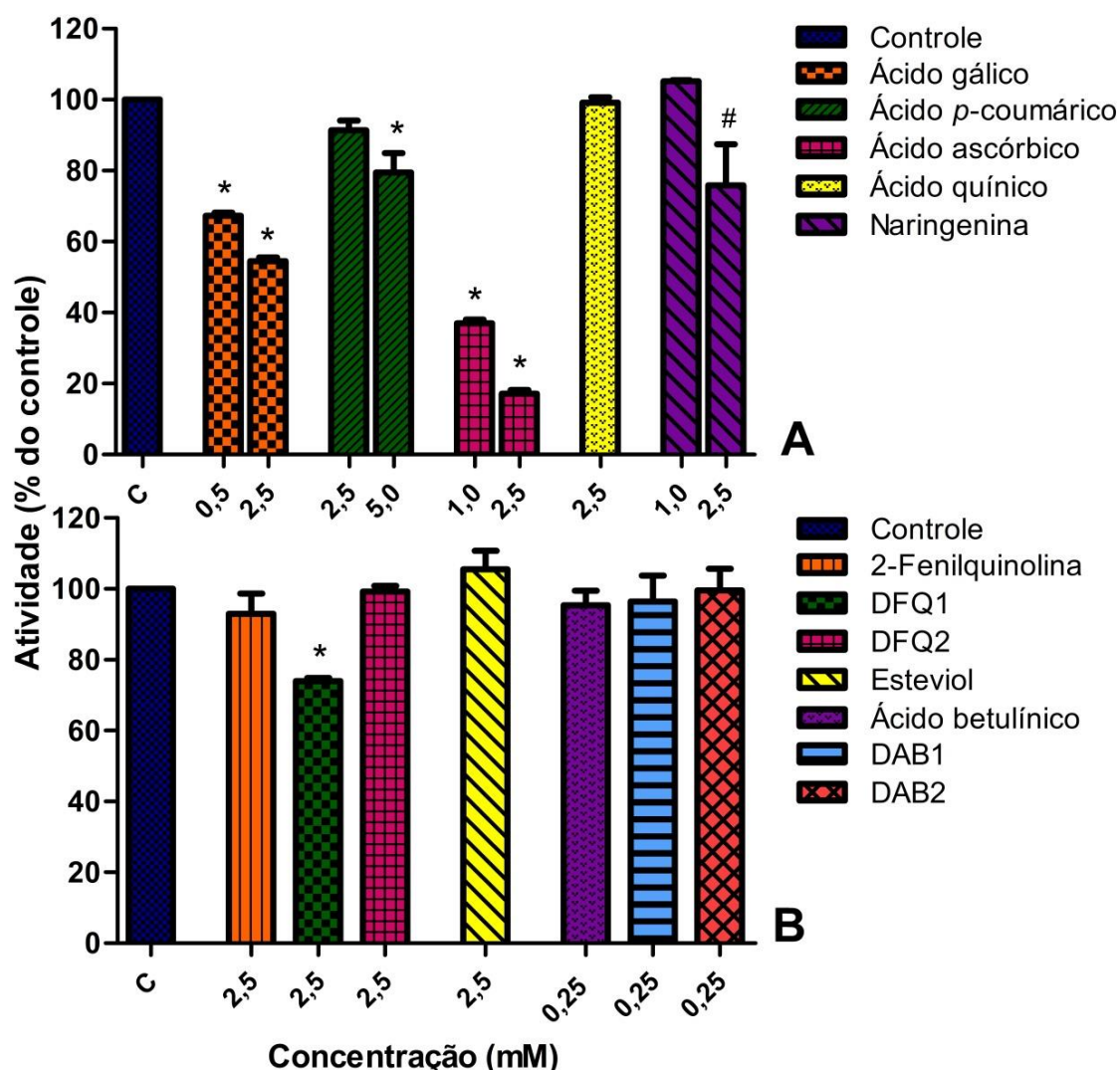


FIGURA 38 – ATIVIDADE DO IMER DE TIROSINASE NA PRESENÇA DE INIBIDORES TESTE  
 NOTA: DFQ – derivados da 2-fenilquinolina; DAB – derivados do ácido betulínico. Resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3, \* $p$ <0,0001 e # $p$ <0,05 comparado ao controle).

Poucos alcaloides (Shaheen et al., 2005; Si et al., 2013), diterpenos (Ko et al., 2008) e triterpenos são descritos na literatura como inibidores da tirosinase. O alcaloide 2-fenilquinolina (VII) e o diterpeno esteviol (VIII) não inibiram a tirosinase imobilizada (Figura 38-B), e nenhum relato na literatura foi encontrado indicando que os mesmos possuem esta ação. O triterpeno ácido betulínico (IX) e seus dois derivados DAB1 e DAB2 também não inibiram a atividade do IMER (Figura 38-B), apesar de um trabalho anterior apresentar o ácido betulínico como inibidor da tirosinase (Ullah et al., 2007). Neste trabalho de Ullah e colaboradores (2007) o ácido betulínico foi previamente solubilizado em metanol 2,5% e a enzima ficou por

10 min exposta ao ácido betulínico nesta concentração de solvente antes do substrato L-DOPA ser adicionado e a reação ser monitorada. Além da solubilização completa do ácido betulínico ser bastante difícil nesta concentração de metanol, os autores não citam realização de controle com metanol nas mesmas condições que o teste, o que pode acarretar em resultados falso-positivos. Além disso, a estrutura química do ácido betulínico não apresenta características condizentes com inibidores da tirosinase.

Os dois derivados hidroxilados da 2-fenilquinolina apresentaram diferentes comportamentos com relação a tirosinase imobilizada. O que difere estas estruturas é o número e a posição das hidroxilas ligadas aos grupos fenólicos da molécula. O difenol DFQ1 (2,5 mM) inibiu a enzima em aproximadamente 26% e o monofenol DFQ2 (2,5 mM) não apresentou ação inibitória (Figura 38-B). Sabe-se que monofenóis e difenóis de fato possuem comportamento diferenciado com relação a tirosinase. Ambos podem ser convertidos ao derivado oxidado pela forma  $E_{OX}$  da enzima, mas a forma  $E_M$  somente catalisa a oxidação de difenóis (Deeth & Diedrich, 2010). Pressupondo que parte da enzima imobilizada está na forma  $E_M$  dentro da coluna, já que a interconversão das formas enzimáticas é constante, o DFQ1 pode atuar competindo com a L-DOPA pelo sítio ativo desta forma enzimática. Além disso, esse derivado difenol possui duas hidroxilas em posição *para* em um dos anéis fenólicos, sendo esta parte da estrutura semelhante a da hidroquinona. Com isso, o DFQ1 pode atuar ligando-se aos resíduos de histidina do sítio ativo da tirosinase e inibindo a ação enzimática, da mesma maneira que a hidroquinona.

A 2-fenilquinolina e seus derivados quinolínicos são agentes com alta atividade anti-leishmania (Fournet et al., 1994; Fournet et al., 1996). A biotransformação por fungos da 2-fenilquinolina foi capaz de convertê-la em um derivado inédito (DFQ1) mais solúvel em água que seu precursor, o que melhora a biodisponibilidade no organismo, e ainda com atividade inibidora da tirosinase. Para explorar esta atividade inibitória, um estudo para determinação de seu valor de  $CI_{50}$  com relação a inibição da tirosinase imobilizada foi realizado. Para tanto, diferentes concentrações do derivado (0,05 a 7,5 mM) foram injetadas no IMER de tirosinase na presença de L-DOPA 5 mM, e controle foi realizado com injeção de L-DOPA 5 mM na ausência do inibidor. A redução na área do pico de dopacromo comparado ao controle foi usada para cálculo da porcentagem de inibição para cada

concentração do DFQ1. A figura 39 apresenta um gráfico log da concentração de DFQ1 *versus* porcentagem de inibição, a partir do qual o valor de  $CI_{50}$   $8,76 \pm 0,36$  mM foi determinado por análise de regressão não-linear. Apesar do DFQ1 apresentar  $CI_{50}$  mais alto que o padrão ácido kójico ( $4,57 \pm 0,81$  mM), esta substância teve seu potencial de aplicação na terapia anti-hiperpigmentar detectado pelo IMER de tirosinase, e deve ser considerada para estudos mais aprofundados sobre seu modo de ação.

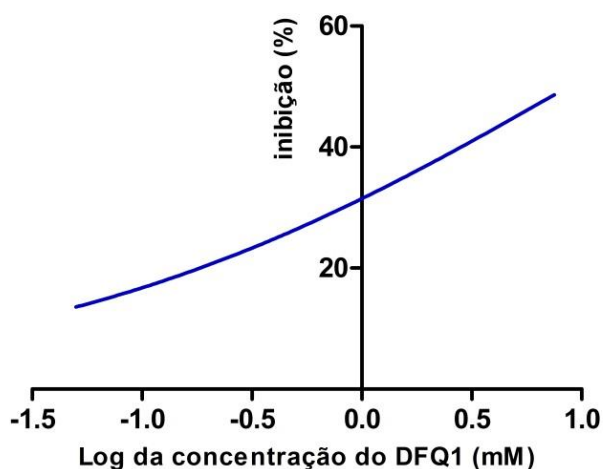


FIGURA 39 – INIBIÇÃO DA TIROSINASE IMOBILIZADA PELO DFQ1  
 NOTA: DFQ1 – derivado inédito da 2-fenilquinolina obtido por biotransformação com fungos.

Os resultados obtidos para os derivados inéditos da 2-fenilquinolina e do ácido betulínico, DFQ1, DAB1 e DAB2, foram confirmados pelo método padrão de determinação da atividade de tirosinase por espectrometria (item 4.2.3.1). A atividade da tirosinase foi determinada como porcentagem com relação ao controle, como apresentado pelo gráfico da figura 40. A inibição da atividade da tirosinase livre foi de  $23,19 \pm 1,83$ ,  $2,71 \pm 3,99$  e  $1,46 \pm 1,29\%$ , para DFQ1, DAB1 e DAB2, respectivamente. Estes resultados não foram significativamente diferentes dos encontrados para inibição à tirosinase imobilizada (Tabela 5). Isto significa que a triagem de inibidores através do IMER de tirosinase origina resultados comparáveis aos apresentados pelo método comum de triagem de inibidores com a enzima livre, além de apresentar vantagens, como a reutilização enzimática e a necessidade de pequena quantidade das substâncias testes.

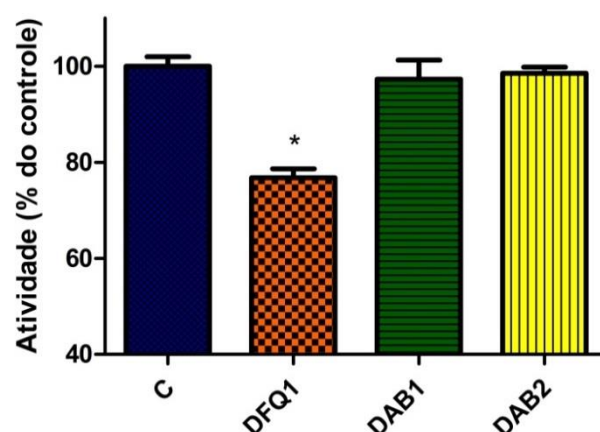


FIGURA 40 – ATIVIDADE DA TIROSINASE LIVRE NA PRESENÇA DE DFQ1, DAB1 E DAB2  
 NOTA: C – controle; DFQ1 – derivado inédito da 2-fenilquinolina obtido por biotransformação com fungos; DAB1 e DAB2 – derivados inéditos do ácido betulínico obtidos por síntese química. Todas as substâncias foram testadas na concentração 0,25 mM. Resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3; \* $p$ <0,0001 com relação ao controle).

Em conclusão, o reator de tirosinase imobilizada pode ser aplicado eficientemente para a triagem e descoberta de novos inibidores enzimáticos. Os resultados obtidos foram comparáveis com aqueles trazidos pela literatura e com os apresentados pelo método padrão de triagem de inibidores da tirosinase. Este é o primeiro trabalho de aplicação de reatores de tirosinase imobilizada para esta finalidade na literatura.



## 5 REATORES DE DI-HIDROFOLATO REDUTASE IMOBILIZADA

Esta parte do trabalho foi desenvolvida em parceria com o departamento de Química Medicinal da Faculdade de Farmácia, na University of Minnesota, MN, Estados Unidos.

### 5.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 5.1.1 Di-hidrofolato redutase

A di-hidrofolato redutase (DHFR) [5,6,7,8-tetra-hidrofolato:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (EC 1.5.1.3)] é o alvo enzimático de várias drogas terapêuticas importantes. Está presente em todas as células que se dividem e mantém os níveis de coenzimas reduzidas de folato, as quais são essenciais para a reprodução celular. (Oefner et al., 1988). Esta enzima é expressada e purificada de várias fontes, incluindo *Lactobacillus casei* (Gundersen et al., 1972; Pastore et al., 1974), *Lactobacillus leichmannii* (Kessel & Roberts, 1965), *Mycobacterium tuberculosis* (Czekster et al., 2011), *Streptococcus faecium* (D'Souza et al., 1972), bacteriófago T4 (Erickson & Mathews, 1973) e *Escherichia coli* (Poe et al., 1972; Baccanari et al., 1975; Annis et al., 2004). A enzima obtida desta última fonte é a mais estudada com relação a sua purificação, estrutura e cinética, e a mais usada para suas diversas aplicações.

A massa molecular da DHFR isolada de *E. coli* calculado com base na composição de aminoácidos, na velocidade de sedimentação e na eletroforese em gel de SDS, é de 17680, 17470 e 18300 Da, respectivamente. O agregado proteico formado na purificação da DHFR é facilmente tratado com mercaptoetanol ou ditioneitol, resultando num aumento da atividade enzimática e na regeneração do monômero. O pH ótimo para a atividade enzimática foi estimado em 7,0 (Baccanari et al., 1975). A DHFR é uma enzima pequena com um sítio ativo grande, possuindo em sua estrutura dois resíduos de cisteína, quatro de triptofano, cinco de histidina e quatro de metionina (Poe et al., 1972). A estrutura cristalizada da DHFR humana recombinante, com folato ligado no seu sítio ativo, já foi previamente estabelecida (Oefner et al., 1988).

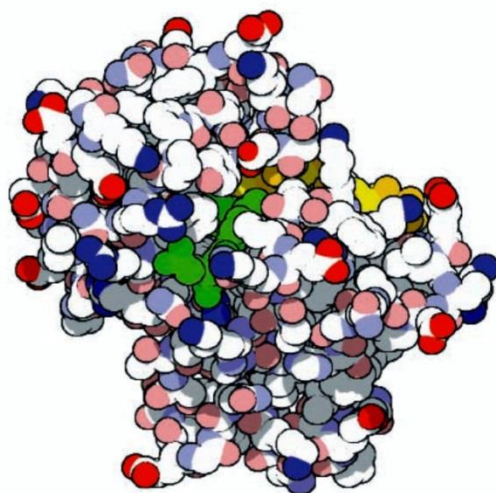


FIGURA 41 – MOLÉCULA DA DI-HIDROFOLATO REDUTASE, COM DI-HIDROFOLATO (VERDE) LIGADO AO SEU SÍTIO ATIVO, AO LADO DO NADPH (AMARELO)  
 FONTE: GOODSSELL, D.S. (1999)

A DHFR catalisa a redução do 7,8-di-hidrofolato (DHF), a partir da transferência de hidrogênio para o nitrogênio 5 da molécula de substrato quando no complexo ternário enzima-NADPH-di-hidrofolato. A mesma reação não foi observada para o complexo binário enzima-di-hidrofolato, explicando a necessidade do cofator NADPH para a ação catalítica da enzima (Stone & Morrison, 1984; Morrison & Stone, 1988). DHF liga-se no sítio ativo enzimático ao lado do NADPH, e a catálise ocorre quando os dois entram em contato no interior da enzima (Goodsell, 1999) (Figura 41). A transferência de hidrogênio do NADPH para o DHF reduz este último para 5,6,7,8-tetra-hidrofolato (THF), com oxidação simultânea do NADPH a  $\text{NADP}^+$  (Figura 42).

O produto da reação THF é necessário para a síntese *de novo* da timina, do ácido timidílico e de certos aminoácidos, todos importantes para a síntese de DNA e proliferação celular. Esta síntese tem como enzima principal a timidilato sintase, a qual é responsável pela adição de um grupo metila na base pirimídica uracila, formando a timina. Esse grupo adicional é essencial para a discriminação da timina das outras três bases de DNA por fatores de transcrição, repressores e outras proteínas ligantes do DNA. O grupo metila é entregue à timidilato sintase pelo THF, o qual nesse caso funciona como um cofator enzimático. No curso da reação, quando a metila é transferida do THF à uracila, a molécula de THF é oxidada a DHF. É nesse ponto que a DHFR torna-se essencial, pois esta enzima reestabelece os níveis da forma reduzida THF a partir do DHF, tornando possível o início de um novo

ciclo de biossíntese da timina. Se esta ação da DHFR é bloqueada, a célula morre. Por isso, a DHFR é considerada uma enzima chave para o metabolismo normal de folatos em procariotos e eucariotos. E o ácido fólico (folato) é considerado uma vitamina essencial para os humanos, sendo posteriormente reduzido a THF no organismo (Goodsell, 1999; Tehei et al., 2006).

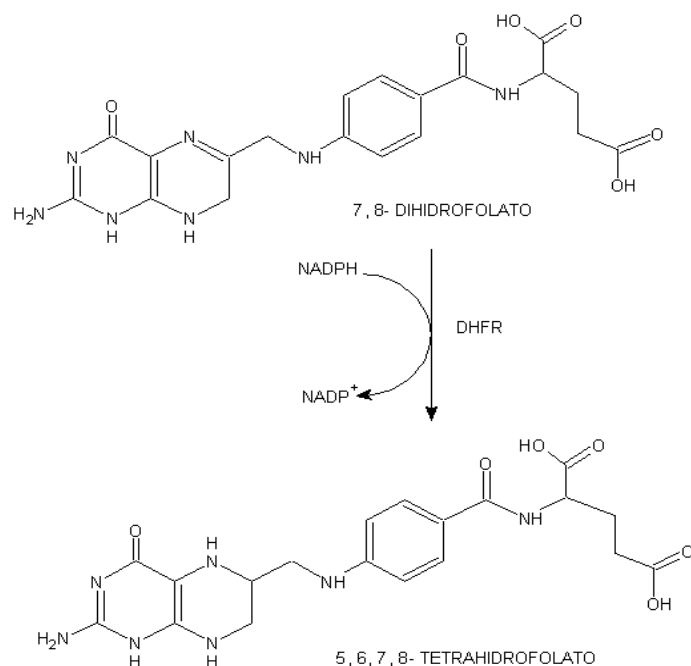
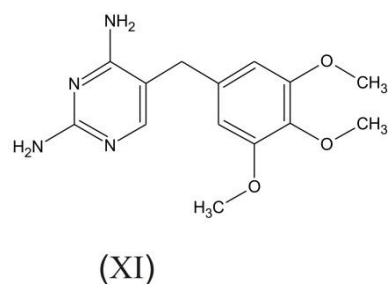
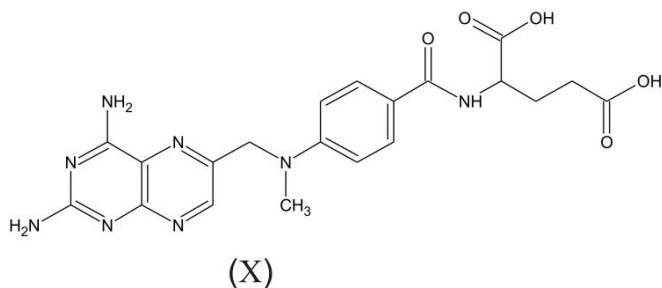


FIGURA 42 – REDUÇÃO DO 7,8-DI-HIDROFOLATO A 5,6,7,8-TETRA-HIDROFOLATO PELA DI-HIDROFOLATO REDUTASE

Essa ação central da DHFR na síntese de precursores de DNA tem feito desta enzima alvo para o desenvolvimento de drogas para tratamento de câncer e uma variedade de doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários e fungos. Na literatura, os inibidores da DHFR, ou antifolatos, são classificados como clássicos e não-clássicos. Os inibidores clássicos são considerados substratos enzimáticos e apresentam estruturas análogas ao substrato natural ácido fólico (folato), apresentando um grupamento ácido na parte distal da molécula. Antifolatos não-clássicos são análogos lipofílicos da molécula de folato, deficientes da porção glutamato, e não são substratos enzimáticos (Kompis et al., 2005).

O metotrexato (MTX) (X) é um inibidor clássico da DHFR, que liga-se fortemente a enzima de maneira competitiva, sendo considerado o antifolato de uso clínico mais efetivo (Volpato et al., 2009). Esta substância é usada para tratamento

de câncer (Daw et al., 2006; Slamon et al., 2006) e de doenças autoimunes como artrite idiopática juvenil (Ramanan et al., 2003), artrite reumatóide (Andersson et al., 2000) e psoríase (Nast et al., 2007). Quando o MTX é usado na clínica, o nível de folatos na forma reduzida no organismo despenca, e a síntese de timina é bastante prejudicada. Existe evidência ainda de que o MTX também bloqueia outras etapas da síntese de nucleotídeos, prejudicando também a síntese de purinas. Como a timina disponível é rapidamente esgotada, os níveis normais de uracila aumentam, e esta base é erroneamente adicionada à cadeia de DNA no lugar da timina. Consequentemente, a síntese de DNA é reduzida, e a fragmentação do DNA é promovida, já que enzimas reparadoras tentam sem sucesso remover os nucleotídeos defeituosos (Goodsell, 1999).



Trimetoprima (TMP) (XI) é outro inibidor da DHFR de amplo espectro, usada com sucesso, geralmente associada a sulfametazol, no tratamento de infecções bacterianas (Frey et al., 2012). Porém, mutações pontuais na DHFR tem sido associadas à redução da sensibilidade a TMP, sendo necessário o desenvolvimento de novos agentes para combater as cepas resistentes (Kompis et al., 2005). Pirimetamina e cicloguanil são inibidores da DHFR usados no tratamento da malária, sendo o primeiro, associado a dapsona, uma combinação usada junto a cloroquina para a profilaxia da doença em áreas de alto risco (Kompis et al., 2005). Várias drogas antifolatos novas estão sendo usadas e estudadas quanto as suas aplicações na área clínica, como o premetrexed, o raltitrexed, o trimetrexato e o brodimoprim (Kompis et al., 2005; Genova et al., 2013).

### 5.1.2 Imobilização da DHFR

Poucos autores na literatura relatam a imobilização da DHFR, e todos trabalharam com a enzima imobilizada de forma aberta (*batch-wise*) e não na forma de reator de enzima imobilizada ou IMER. DHFR foi primeiramente imobilizada por Ahmed e colaboradores em Sepharose-CH ativada com carbodiimida ou em Sepharose ativada com brometo de cianogênio, para a biossíntese de THF a partir de DHF e NADPH (Ahmed & Dunlap, 1984b; Ahmed & Dunlap, 1984a). Imobilização de uma forma mutante da DHFR, com seus dois resíduos de cisteína naturais substituídos e inserção de uma cisteína C-terminal, foi realizada em superfície de ouro e em gel de tiopropil Sepharose de maneira mais eficiente do que para a enzima na sua forma selvagem, sendo que em ambas as imobilizações a enzima manteve sua atividade catalítica (Iwakura & Kokubu, 1993; Vigmond et al., 1994). Em outro trabalho recente, a enzima na sua forma nativa foi imobilizada em superfícies planas de ouro de forma covalente, também com manutenção de sua atividade (Ditzler et al., 2011). DHFR foi encapsulada em materiais derivados de sol-gel, como tetraetil ortosilicato (TEOS) ou digliceril silano (DGC), com manutenção de sua estabilidade a longo prazo e de sua eficiência catalítica (Besanger et al., 2003). Imobilização da DHFR foi realizada por ligação covalente em sílica micro porosa Sunsphere H122, previamente ativada com triclorotriazina na presença de trietilamina, e análise da dinâmica da enzima livre e imobilizada foi realizada (Tehei et al., 2006). Outro autor fez imobilização de uma forma mutante da DHFR, contendo um resíduo de cisteína C-terminal, em tiopropil Sepharose. A enzima imobilizada foi então usada para seleção de inibidores fortes (Thongpanchang et al., 2007).

Levando em consideração as imobilizações realizadas até o momento com a DHFR, vê-se que suas aplicações são pouco exploradas. Somente dois grupos de autores aplicam a enzima imobilizada para fins de biocatálise ou para detecção de inibidores enzimáticos. Além disso, não há relatos na literatura de desenvolvimento de IMER dessa enzima para exploração *on-line* de sua atividade. Com isso, este trabalho teve como um dos objetivos desenvolver reatores de DHFR imobilizada, e testar a aplicação deste sistema na purificação de macromoléculas marcadas, como um sistema de cromatografia de bioafinidade.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Materiais

Células de *E. coli* One Shot<sup>®</sup> BL-21 (DE3) e padrões para SDS-PAGE foram obtidos da Invitrogen. Reagente Coomassie Blue para os ensaios de quantificação de proteína foi obtido da BioRad. (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTMS), metotrexato (MTX), metotrexato-agarose para cromatografia de bioafinidade, lisozima, ampicilina, ácido fólico, glicina (Gly) e albumina de soro bovino (BSA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e ditioneitol (DTT) foram obtidos da Fischer Scientific (Chicago, IL). Trimetoprima (TMP) foi obtida da MP Biomedicals. LiChrosorb Si 100 (10  $\mu$ m) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) foram obtidos da Merck. Ácido di-hidrofólico (DHF) foi sintetizado de acordo com o método de Blakley, com algumas modificações (Blakley, 1960) (item 5.2.3). DEAE-celulose de troca aniônica (microgranular DE52) foi produzida por Whatman International, Ltd. Sistema de filtração a vácuo Corning<sup>®</sup>, com membrana de acetato de celulose (diâmetro de poro 0,22  $\mu$ m), foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Dados espectrofotométricos foram coletados num espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-Vis (Palo Alto, CA). Análises de CLAE foram realizadas num sistema Beckman/Coulter Gold equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) (Fullerton, CA). Colunas de aço inoxidável vazias para CLAE (50 mm x 4.6 mm; 100 mm x 4.6 mm) e acessórios cromatográficos foram obtidos da Chrom Tech (Apple Valley, MN). Filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de poro de 0,45  $\mu$ m, foram obtidos da Millipore. Todos os tampões e soluções aquosas para CLAE foram filtrados por filtro de acetato de celulose, diâmetro de poro 0,22  $\mu$ m, antes do uso. Todos os outros reagentes químicos e solventes usados eram grau analítico ou CLAE e foram usados sem purificação prévia.

### 5.2.2 Obtenção das enzimas DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>

A obtenção das enzimas foi realizada a partir da transformação e expressão de seus respectivos plasmídeos codificadores em células competentes de *E. coli*,

com posterior purificação das proteínas solúveis a partir das culturas bacterianas por meio de técnicas cromatográficas (Carlson et al., 2006).

A construção dos plasmídeos que codificam as enzimas DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> foi realizada por colaboradores. DHFR corresponde a proteína monomérica (Figura 43 – A). DHFR<sup>2</sup> corresponde a um dímero mutante da DHFR, com uma cadeia ligante de 13 aminoácidos (GLGGGGGLVPRGT) entre as duas unidades proteicas, e com mutação dos resíduos de cisteína para alanina ou serina (Figura 43 – B). E a DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> corresponde ao mesmo dímero mutante DHFR<sup>2</sup> adicionado de uma cadeia Glicina-Glicina-Cisteína (GGC) na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica (Figura 43 – C). Foi comprovado anteriormente que a mutação dos resíduos de cisteína da proteína selvagem para alanina ou serina retém completamente a atividade enzimática e a afinidade de ligação ao MTX (Li et al., 2008; Li et al., 2010).

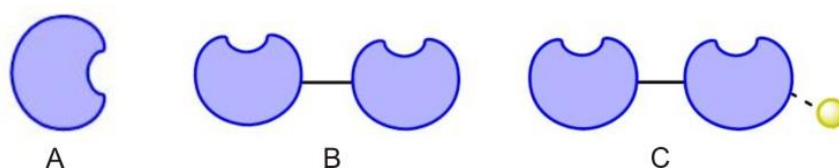


FIGURA 43 – ESQUEMA REPRESENTANDO A FORMA MONOMÉRICA (A), DIMÉRICA MUTANTE (B) E DIMÉRICA MUTANTE COM RESÍDUO DE CISTEÍNA TERMINAL (C) DA DHFR  
NOTA: DHFR<sup>2</sup> contém duas unidades de DHFR (azul) conectadas por uma cadeia de 13 aminoácidos (linha preta reta entre as unidades azuis). DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> contém um grupamento cisteína terminal (amarelo).

#### 5.2.2.1 Transformação dos plasmídeos em células de *E. coli*

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) resistentes a ampicilina foram transformadas com os plasmídeos codificadores das enzimas de acordo com as instruções do fabricante Invitrogen. Para tanto, uma alíquota de células fornecida pelo fabricante, capaz de ser transformada em quantidade maior que  $1 \times 10^8$  ufc/  $\mu$ g de plasmídeo utilizado, foi gentilmente misturada a 5-10 ng de plasmídeo e incubada em gelo por 30 min. Em seguida, as células passaram por um choque térmico, permanecendo em um banho a 42 °C por exatos 30 s, e foram novamente colocadas em gelo. Alíquota de 250  $\mu$ L de meio de cultura LB (caldo de lisogenia, *lysogeny broth*) (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L) previamente autoclavado foi adicionado às células, e estas foram mantidas em

agitação a 37 °C por 1 h. Volume de 20 ou 200 µL desta suspensão foi, então, adicionado a placas de meio de cultura esterilizado ágar-LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, ágar 20 g/L) contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram invertidas e incubadas *overnight* a 37 °C para crescimento bacteriano (Invitrogen, 2010).

#### 5.2.2.2 Preparação e purificação das enzimas a partir de culturas de *E. coli*

As colônias bacterianas contendo os plasmídeos que codificam as enzimas de interesse foram selecionadas nas placas de meio ágar-LB contendo ampicilina. Uma única colônia foi pinçada e colocada para crescer em 5 mL de meio de cultura LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, a 37 °C com agitação por 12-18 h. Alíquota de 2,5 mL desta cultura foi transferida para um novo meio de cultura LB (100 mL), contendo a mesma concentração de ampicilina, e foi mantida em agitação a 37 °C por 12-18 h. Por fim, duas alíquotas de 25 mL desta cultura foram transferidas cada uma para 1 L de meio LB com ampicilina, totalizando 2 L de cultura final, e esta foi exposta às mesmas condições de crescimento pelo tempo necessário para a densidade óptica (DO) a 600 nm atingir 0,6. Neste momento, as células foram induzidas com IPTG 0,35 mM e incubadas novamente a 37 °C por 4 h para crescimento, ponto em que a DO<sub>600</sub> encontrava-se maior que 1,5. As culturas foram então centrifugadas a 7500g por 30 min a 4 °C, gerando os pellets celulares.

Os pellets celulares foram suspensos em 8-10 mL de tampão de lise celular (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, lisozima 1 mg/mL, pH 8,0) e incubados a temperatura ambiente com agitação suave por 30 min. Em seguida, o lisado viscoso foi resfriado num banho de gelo e sonicado 24 x 15 s, com intervalo entre cada repetição para permitir que a temperatura do material fosse mantida menor que 10 °C. O lisado celular foi então centrifugado a 40000g por 45 min a 4 °C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi dialisado *overnight* a 4 °C contra 2 L de tampão de equilíbrio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 0,5 mM, DTT 1 mM, pH 6,0).

O dialisado contendo a proteína de interesse foi carregado a 1 mL/min numa coluna de bioafinidade de metotrexato, previamente condicionada com tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,0). Após carregamento total,



a coluna foi primeiramente lavada com tampão de alto teor salino ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 1 M, pH 6,0) até a  $\text{DO}_{260}$  e a  $\text{DO}_{280}$  do eluente ser menor que 0,05. Posteriormente, a proteína parcialmente purificada foi eluída com tampão folato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 1 M, folato 1-5 mM, DTT 1 mM, pH 9,0) a 1 mL/min, e coletada em frações de 8 mL. As frações foram avaliadas quanto a atividade de DHFR através do protocolo preestabelecido (item 5.2.4) (Sticha et al., 1997). As frações que apresentaram atividade enzimática foram combinadas, concentradas e dialisadas contra tampão de equilíbrio (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,2) usando um sistema de ultrafiltração Millipore Amicon com membranas YM-10 (poro de 10 kDa) ou YM-30 (poro de 30 kDa), dependendo da forma proteica sendo purificada.

O concentrado proteico dialisado foi posteriormente carregado a 1 mL/min numa coluna de DEAE-celulose previamente condicionada com o mesmo tampão de equilíbrio. Após carregamento total da amostra, a coluna foi lavada com mais 200 mL de tampão de equilíbrio e depois eluída por 500 min com um gradiente linear de tampão de equilíbrio para tampão de eluição (Tris 10 mM, KCl 0,5 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,2). Frações de 8 mL foram coletadas e avaliadas quanto a presença de proteína pela  $\text{DO}_{260}$  e  $\text{DO}_{280}$ , sendo posteriormente analisadas por SDS-PAGE (item 5.2.2.3). As frações contendo a enzima purificada foram combinadas e concentradas usando o mesmo sistema de ultrafiltração Millipore Amicon com membrana YM-10 ou YM-30. A proteína purificada foi armazenada a 30 % (v/v) em solução de glicerol (50%  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v)) a  $-80^\circ\text{C}$  até o uso.

Para os experimentos de imobilização, aproximadamente 1,5 mg de proteína purificada, correspondente às enzimas DHFR,  $\text{DHFR}^2$  e  $\text{DHFR}^2_{\text{Cys}}$ , foi colocado em 20 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, KOH para pH 6,5), e a solução foi filtrada por membrana de acetato de celulose de poro 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

### 5.2.2.3 Análise das proteínas purificadas

A pureza das enzimas DHFR,  $\text{DHFR}^2$  e  $\text{DHFR}^2_{\text{Cys}}$  e o progresso das etapas de purificação foram determinados por eletroforese segundo método previamente descrito (Sticha et al., 1997). Para tanto, as amostras foram previamente misturadas

com 1/6 de volume de tampão de carregamento 6x (Tris- HCl 62,5 mM, pH 8,0; SDS 6%; 2-mercaptoetanol 5%; glicerol 40%; azul de bromofenol 0,05%), e aquecidas a 100 °C por 5 min. A seguir, as amostras tiveram as proteínas separadas em SDS-PAGE 12% (Invitrogen) e padrão de massa molecular foi usado para identificação das bandas. As bandas de proteína foram observadas após coração do gel com solução de azul de Coomassie (Azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% em metanol: ácido acético: água (4:1:5 v/v/v)).

A determinação de proteína nas amostras purificadas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando BSA como padrão. Este teste foi realizado com o reagente Coomassie para ensaio de proteínas de acordo com as instruções do fabricante (BioRad).

### 5.2.3 Síntese do ácido di-hidrofólico

O ácido di-hidrofólico (DHF) foi sintetizado de acordo com o método de Blakley, com algumas modificações (Blakley, 1960). Para tanto, 2 g de ácido ascórbico foi dissolvido em 10 mL de água bidestilada com agitação mecânica e monitoração contínua do pH. O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M, e o volume foi completado para 20 mL com água bidestilada. Solução de ácido fólico (ácido pteroilglutâmico) (76,4 mg em 3,2 mL de NaOH 0,1 M) foi adicionada, e obteve-se uma solução límpida de coloração amarela/alaranjada. Após isso, 800 mg de hidrossulfito de sódio foi adicionado com agitação mecânica até completa dissolução. Manteve-se a agitação por mais 5 min a temperatura ambiente, e a solução foi então colocada em banho de gelo sob agitação para resfriamento até 5 °C. HCl 1 M foi usado para reduzir o pH para 2,8 e agitação mecânica foi continuada por 5 min para uma precipitação completa. A solução foi então transferida para um tubo cônico e centrifugada a 4 °C por 10 min a 7000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 20 mL de ascorbato de sódio 10% pH 6,0 (2 g de ascorbato em 20 mL de água bidestilada, com ajuste de pH para 6,0 com NaOH) gelado e recentemente preparado. O pH foi monitorado constantemente sob agitação e corrigido para 6,0 com NaOH. O DHF solubilizado foi então recristalizado com adição lenta de HCl 1 M (0,5 mL/min) até pH 2,8. Após 5 min de precipitação completa, a solução foi centrifugada a 4 °C por 10 min a 7000g, o sobrenadante foi

descartado, e o precipitado foi lavado três vezes com 10 mL de HCl 1 mM gelado, com ressuspensão e centrifugação em cada lavagem. O último precipitado foi então ressuspensão em 2,5-3,0 mL de HCl 1 mM, a solução foi aliquoteada em volumes de 25 µL e mantida em atmosfera de argônio a -70 °C até o uso.

#### 5.2.4 Método para determinação da atividade da DHFR livre

Soluções estoque de NADPH e DHF foram preparadas em tampão MTEN (MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico) 50 mM, Tris 25 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,0; etanolamina 25 mM). A concentração das soluções foi determinada espectrofotometricamente usando o coeficiente de extinção molar 0,0062/µM para o NADPH a 340 nm e 0,028/µM para o DHF a 280 nm. Aliquota de 100 µL da solução proteica a ter a atividade de DHFR determinada foi adicionada de volume adequado de solução de NADPH para concentração final de 100 µM, e de tampão MTEN para volume final de 1 mL, considerando o volume de substrato a ser adicionado subsequentemente. Em seguida, 50 µL de solução de DHF para concentração final de 50 µM foi rapidamente misturado à solução, e a redução da absorvância a 340 nm foi determinada em espectrofotômetro UV por 1 min (Huang et al., 1994). A fase log linear ( $r > 0,99$ ) da curva foi selecionada, e a diferença entre a absorvância inicial e final foi convertida como a quantidade de NADPH consumida (µM). A unidade µM de NADPH consumido/min foi usada para determinar a atividade enzimática.

#### 5.2.5 Estabilidade da enzima livre

As enzimas DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> purificadas foram avaliadas com relação a estabilidade na forma livre. Para tanto, soluções enzimáticas foram preparadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KOH para pH 7,0) adicionado de azida sódica 0,01% (m/v), e mantidas a 4 °C por 30 dias. Aliquotas de 100 µL foram retiradas em intervalos de tempo definidos e tiveram a atividade enzimática determinada pelo método descrito no item 5.2.4. Comparação da atividade inicial e final para cada período analisado foi realizada.

#### 5.2.6 Desenvolvimento dos reatores de DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada

A imobilização das enzimas DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> foi realizada pela técnica *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas. Análise dos reatores obtidos foi realizada com relação ao teor de enzima imobilizada, atividade enzimática retida, capacidade catalítica do reator e estabilidade. A partir dos resultados obtidos, definiu-se a melhor forma enzimática a ser imobilizada para posterior aplicação do reator em áreas de interesse.

##### 5.2.6.1 Síntese da epoxisílica por micro-ondas

Uma massa de 1,5 g de sílica Lichrosorb Si 100, previamente seca em estufa por 15 h a 120 °C, foi adicionada de 9,75 mL de metanol e 0,25 mL de GPTMS. A mistura foi agitada por 10 min e, após isso, evaporou-se o solvente em rotaevaporador, com temperatura máxima de 60 °C. A sílica recoberta pelo GPTMS foi então aquecida em micro-ondas por 5 min a 400 W, e a epoxisílica formada foi lavada com metanol, acetona e éter, com filtração a vácuo em filtro Millipore de PVDF 0,45 µm. Após isso, a epoxisílica foi seca e armazenada a temperatura ambiente (Crosfield & Sons, 1992).

##### 5.2.6.2 Empacotamento das colunas cromatográficas

A coluna a ser empacotada (50 mm x 4,6 mm) foi conectada em sua porção superior à outra coluna de mesmo tamanho. Epoxisílica foi adicionada até completar ambas as colunas, as quais foram acopladas à bomba de CLAE na posição vertical. Metanol e água, respectivamente, foram os dois solventes usados no empacotamento, sendo bombeados pelas colunas num fluxo de até 5 mL/min, com pressão controlada de até 100 bar. Em seguida, a coluna superior foi desacoplada, e a coluna inferior empacotada foi devidamente condicionada com tampão fosfato 10 mM pH 6,5 para os experimentos.

#### 5.2.6.3 Imobilização enzimática *in situ*

Solução enzimática (1,5 mg de proteína em 20 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,5), mantida em banho de gelo, foi recirculada pela coluna de epoxisílica por 4 h a 0,5 mL/min. Alíquotas da solução enzimática foram retiradas durante o processo para acompanhamento do teor de proteína e atividade enzimática. A coluna foi posteriormente lavada com tampão fosfato 10 mM pH 7,0 por 2 h num fluxo de 0,5 mL/min. Solução de glicina 0,1 M foi circulada pela coluna por 2 h a 0,5 mL/min, e, por fim, a coluna foi condicionada com o mesmo tampão fosfato para serem iniciados os testes de atividade enzimática.

#### 5.2.6.4 Proteína e atividade enzimática removida pela imobilização enzimática

A quantidade de enzima imobilizada (mg proteína/g epoxisílica) foi determinada pela diferença no conteúdo de proteína da solução enzimática antes e após a imobilização, e levando em consideração a quantidade de epoxisílica que entrou em contato com a solução enzimática durante a imobilização. A determinação de proteína foi realizada a 280 nm, usando-se uma curva de calibração de BSA (Waddell, 1956).

A atividade enzimática retida pelo processo de imobilização foi determinada pela diferença em porcentagem da atividade da solução enzimática antes e após a imobilização. A atividade foi determinada pelo decréscimo da absorvância a 340 nm de uma solução composta por NADPH 100  $\mu$ M, DHF 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ L de solução enzimática, como descrito anteriormente para a enzima livre no item 5.2.4.

#### 5.2.6.5 Atividade e estabilidade dos reatores enzimáticos

Soluções de NADPH e DHF foram preparadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e suas concentrações foram determinadas espectrofotometricamente. Para determinação da atividade dos reatores 50  $\mu$ L de NADPH 50  $\mu$ M foi injetado em triplicata na coluna, e a área do pico a 340 nm foi determinada. Tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foi usado como fase móvel a 0,5 mL/min por 5 min. Após isso, o mesmo volume de solução de NADPH 50  $\mu$ M contendo 25  $\mu$ M de DHF foi injetado no reator

em triplicata, e a área do pico do NADPH foi novamente avaliada a 340 nm. A redução na área do pico do NADPH na presença de DHF foi calculada como porcentagem (%) da área do pico do NADPH na ausência do substrato. Este valor foi definido como a porcentagem (%) de NADPH consumida pela enzima imobilizada e usado como unidade para a atividade enzimática.

Todos os IMER foram armazenados a 4 °C em solução de azida sódica 0,01% (m/v) quando fora de uso. Determinou-se a estabilidade dos reatores nestas condições através de injeções (50 µL) de solução de NADPH 50 µM na presença e ausência de DHF 25 µM durante intervalos de tempo definidos dentre 30 dias. A atividade das colunas (% de NADPH consumido), determinada como descrito acima, foi usada como parâmetro de estabilidade.

#### 5.2.7 Aplicação do reator de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada

O reator de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada teve seu potencial de aplicação como método para purificação de macromoléculas marcadas testado. Para tanto, um novo IMER de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> foi desenvolvido em uma coluna de 10 cm de comprimento, da mesma forma descrita anteriormente. O reator foi primeiramente avaliado quanto a sua atividade inicial como previamente estipulado (item 5.2.6.5), usando 50 µM de NADPH e 25 µM de DHF. Ligante de bis-metotrexato (bis-MTX) foi sintetizado de acordo com Gangar e colaboradores (2013). Injeções (50 µL) de MTX ou de bis-MTX (50 µM) foram realizadas até saturação da coluna, caracterizada pela perda completa de atividade da mesma. Tampão fosfato 10 mM pH 7,0 foi usado como fase móvel a 0,5 mL/min por 5 min a cada injeção. Em seguida, o IMER foi condicionado por 20 min com tampão fosfato salino (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KOH para pH 7,0; adicionado de KCl 0,5 M), e eluído pelo tempo necessário com o mesmo tampão salino adicionado de 2 µM de TMP. A eluição foi acompanhada a 302 nm. Posteriormente, a coluna foi lavada com tampão fosfato salino por 30 min, até não ser mais observada absorvância a 302 nm, e depois foi condicionada com tampão borato salino (tetraborato de sódio 10 mM, pH 9,0 com ácido bórico; adicionado de KCl 0,5 M) por 30 min. O IMER foi então lavado com tampão borato salino contendo 1 mM de folato por 30 min, e por mais 30 min somente com tampão borato salino, até a completa remoção de folato. Finalmente, o reator foi condicionado com tampão

fosfato 10 mM pH 7,0 por 60 min para novos experimentos. Durante todas as etapas o reator teve a atividade enzimática monitorada.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 Obtenção das enzimas DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>

Três formas enzimáticas foram selecionadas e purificadas para imobilização, a fim de ser verificada a influência da estrutura proteica na eficiência do processo de imobilização, e a melhor forma enzimática a ser imobilizada.

Linhagem competente de *E. coli* BL21(DE3) foi a escolhida para expressar as enzimas. Esta cepa bacteriana não contém proteases *lon* e protease de membrana *OmpT*, para reduzir a degradação de proteínas heterogêneas expressadas pela mesma. A designação DE3 indica que a cepa contém o lisogênio DE3 que carrega o gen da T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*. IPTG é utilizado nos experimentos para induzir a produção enzimática por meio da indução da expressão da T7 RNA polimerase pelo promotor *lacUV5* (Invitrogen, 2010).

Ampicilina foi usada em todas as etapas de crescimento bacteriano a fim de serem selecionadas somente células transformadas com o plasmídeo resistentes à ampicilina, e evitar contaminação. Lisozima foi usada para lise celular já que é capaz de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre resíduos do ácido *N*-acetilmurâmico e da *N*-acetil-D-glucosamina presentes na estrutura da parede celular bacteriana (Lehninger et al., 2007). A temperatura foi mantida menor que 10 °C durante a lise celular com sonicação para evitar o aquecimento da suspensão e prevenir a desnaturação e perda de atividade da enzima de interesse.

O lisado celular foi inicialmente submetido a cromatografia por afinidade em coluna de metotrexato. Nesta etapa, as formas monomérica e dimérica da DHFR são capazes de se ligar ao MTX, pelo qual tem alta afinidade, e serem retidas na coluna, e as outras proteínas da mistura passam livremente sem retenção pela matriz insolúvel. DTT, um agente redutor, foi adicionado nas fases móveis, inclusive nas etapas cromatográficas posteriores, para manter o grupo cisteína da proteína na forma reduzida, prevenindo a formação de ligações dissulfeto entre as moléculas

enzimáticas de interesse e a interação destas de forma não específica com a matriz. Tampão com alto teor salino, para reduzir interação iônica das proteínas com a matriz, foi usado como fase móvel para eliminar grande parte das impurezas e proteínas contaminantes da mistura. A recuperação da enzima de interesse foi realizada com tampão contendo folato, um substrato natural da DHFR, que, em altas concentrações, compete com o MTX pelo sítio ativo enzimático, eluindo a enzima de interesse da coluna.

As frações coletadas contendo a enzima puderam então ser qualitativa e quantitativamente identificadas pela redução da absorvância a 340 nm quando na presença do cofator NADPH e do substrato DHF. A redução da absorvância a 340 nm caracteriza o consumo de NADPH ( $\lambda_{\text{máx}}$  340 nm) pela enzima presente na solução quando esta catalisa a conversão de DHF para THF (Tehei et al., 2006). A figura 44 apresenta um gráfico absorvância (340 nm) *versus* tempo de frações eluídas da coluna de metotrexato que exemplifica a identificação da presença da DHFR. Através deste gráfico é possível observar a ausência de atividade e, consequentemente, da enzima de interesse na fração 1, e a presença da mesma nas frações 3 e 6, mas em maior proporção na fração 3, já que o consumo de NADPH foi mais rápido nesta do que nas outras frações. A partir desta análise, as frações contendo atividade enzimática foram reunidas, e a amostra final foi concentrada e submetida a coluna de troca iônica de DEAE-celulose.

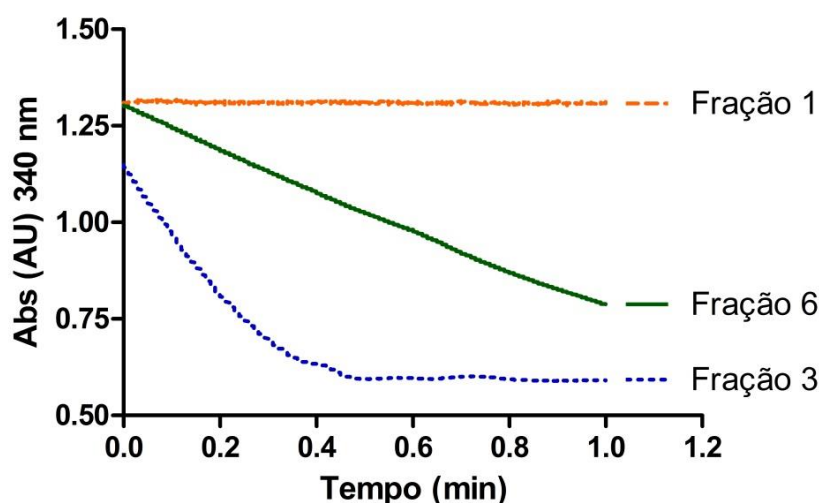


FIGURA 44 – CURVAS CINÉTICAS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA ENVOLVENDO AS FRAÇÕES 1, 3 E 6 ELUÍDAS DA COLUNA DE METOTREXATO DURANTE PURIFICAÇÃO DA DHFR<sup>2</sup>, NA PRESENÇA DE NADPH E DHF



Resina de DEAE-celulose foi capaz de reter o folato e separá-lo da porção proteica da amostra, a qual foi então eluída da coluna por gradiente de tampão com aumento progressivo da concentração salina. As frações coletadas foram avaliadas quanto a presença de proteína, como apresentado no gráfico da figura 45, e aquelas com conteúdo proteico foram analisadas por SDS-PAGE em condição desnaturante para identificação das frações contendo a enzima de interesse purificada (Figura 46). Estas foram reunidas, concentradas e armazenadas corretamente para uso nos experimentos de imobilização. As figuras 47, 48 e 49 apresentam o gel de eletroforese para as etapas de purificação das enzimas. O rendimento prático para as enzimas DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> foi de aproximadamente 3,7, 70 e 25 mg para cada 2 L de cultura bacteriana, respectivamente.

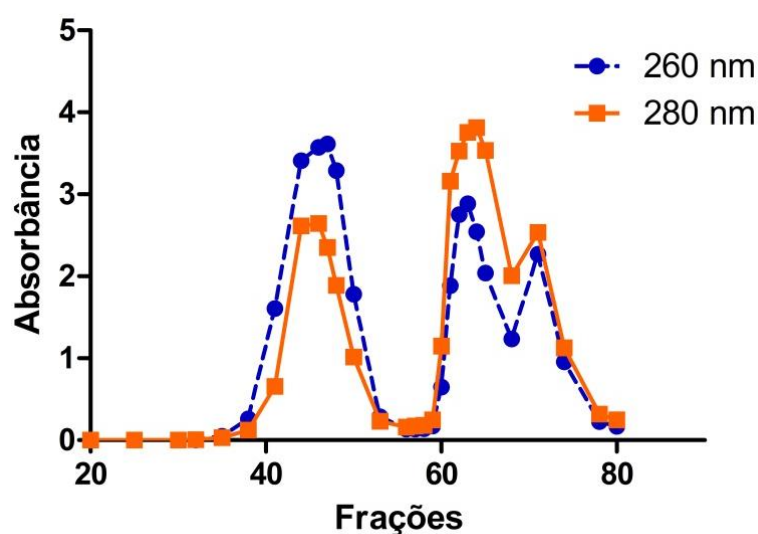


FIGURA 45 – ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE DEAE-CELULOSE DURANTE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR<sup>2</sup>

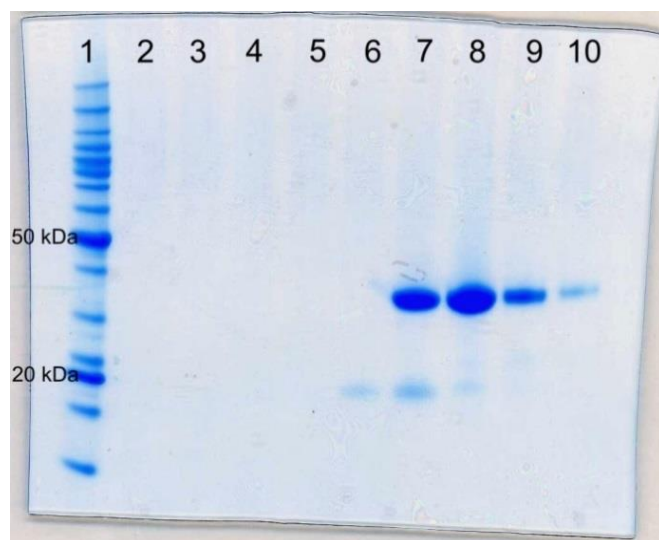


FIGURA 46 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA COLUNA DE DEAE-CELULOSE DURANTE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR<sup>2</sup>  
 NOTA: Padrão de massa molecular (1) e frações 35 (2), 40 (3), 45 (4), 50 (5), 55 (6); 60 (7), 65 (8), 70 (9), 75 (10). Bandas em 7, 8, 9 e 10 correspondem a enzima de interesse.

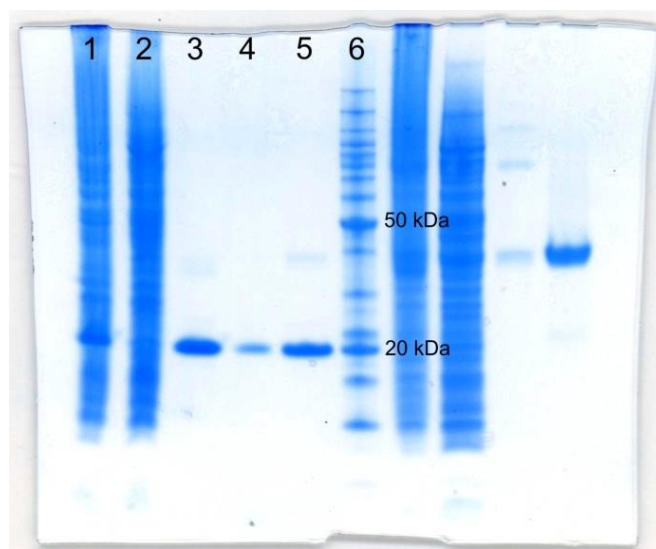


FIGURA 47 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DE FRAÇÕES DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR  
 NOTA: Lisado celular dialisado (1), fração eliminada da coluna de MTX (2), frações coletadas da coluna de MTX aplicadas na coluna de DEAE-celulose (3), fração eliminada pela concentração em Amicon após coluna de DEAE-celulose (4), DHFR purificada (5), padrão de massa molecular (6).

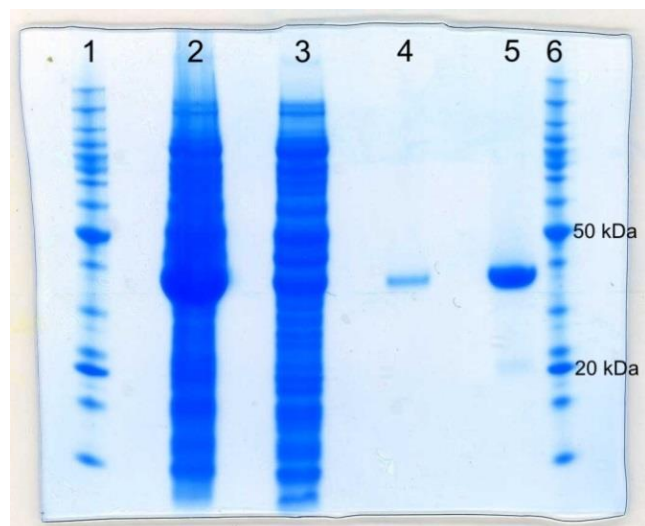


FIGURA 48 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DE FRAÇÕES DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR<sup>2</sup>

NOTA: Padrão de massa molecular (1), lisado celular dialisado (2), fração eliminada da coluna de MTX (3), fração eliminada pela concentração em Amicon após coluna de DEAE-celulose (4), DHFR<sup>2</sup> purificada (5), padrão de massa molecular (6).

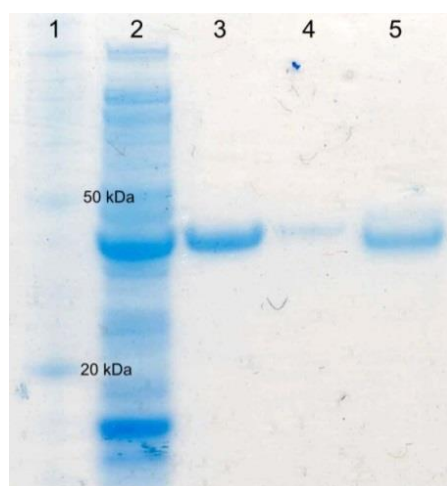


FIGURA 49 – SDS-PAGE EM CONDIÇÃO DESNATURANTE DE FRAÇÕES DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>

NOTA: Padrão de massa molecular (1), lisado celular dialisado (2), DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> purificada (10x) (3), DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> purificada (1x) (4), DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> purificada (5).

### 5.3.2 Desenvolvimento dos reatores de DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada

As três formas enzimáticas purificadas foram imobilizadas pela técnica *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas, como apresentado no esquema da figura 24. A comparação dos resultados obtidos foi realizada com relação ao teor de enzima e de atividade enzimática imobilizada, estabilidade e atividade dos reatores.

### 5.3.2.1 Proteína e atividade enzimática removida pela imobilização enzimática

A quantidade de proteína e a atividade enzimática retida da solução enzimática durante o processo de imobilização foram analisadas em intervalos de tempo durante 4 h. Após 1,5 h de recirculação da solução enzimática pela coluna de epoxisílica, a quantidade de proteína imobilizada e de atividade removida manteve-se inalterada para as três formas enzimáticas (Figuras 50-A e 51-A). Isso significa que neste ponto a coluna já se encontrava saturada pela enzima e todos os grupos epoxi disponíveis reagiram com os grupos reativos enzimáticos. Glicina foi posteriormente usada para reagir com quaisquer grupos epoxi que não tenham se ligado a enzima por algum motivo, como por impedimento estérico. Este procedimento previne reações descontroladas posteriores entre outras moléculas e os grupos epoxi remanescentes do suporte (Bertucci et al., 2003).

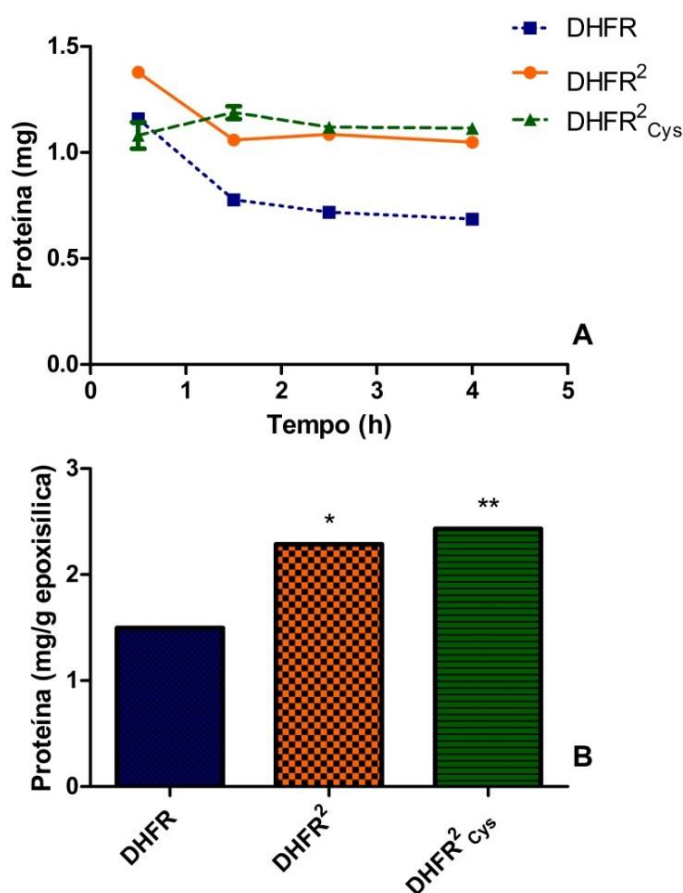


FIGURA 50 - PROTEÍNA IMOBILIZADA DURANTE (A) E APÓS 4 HORAS (B) DE RECIRCULAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA PELA COLUNA DE EPOXISÍLICA

NOTA: Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3). B) \* $p < 0,0001$  comparado a DHFR e a DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>; \*\* $p < 0,0001$  comparado a DHFR e a DHFR<sup>2</sup>.

Após 4 h de imobilização, a quantidade de proteína imobilizada e de atividade enzimática retida foi significativamente maior para a enzima DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>, seguida da DHFR<sup>2</sup> e da DHFR (Figuras 50-B e 51-B). DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> apresentou a melhor capacidade de ligação a epoxissílica. Estes resultados de retenção de proteína e de atividade estão de acordo, já que quanto maior a quantidade proteica imobilizada na coluna mais atividade é retida na mesma.

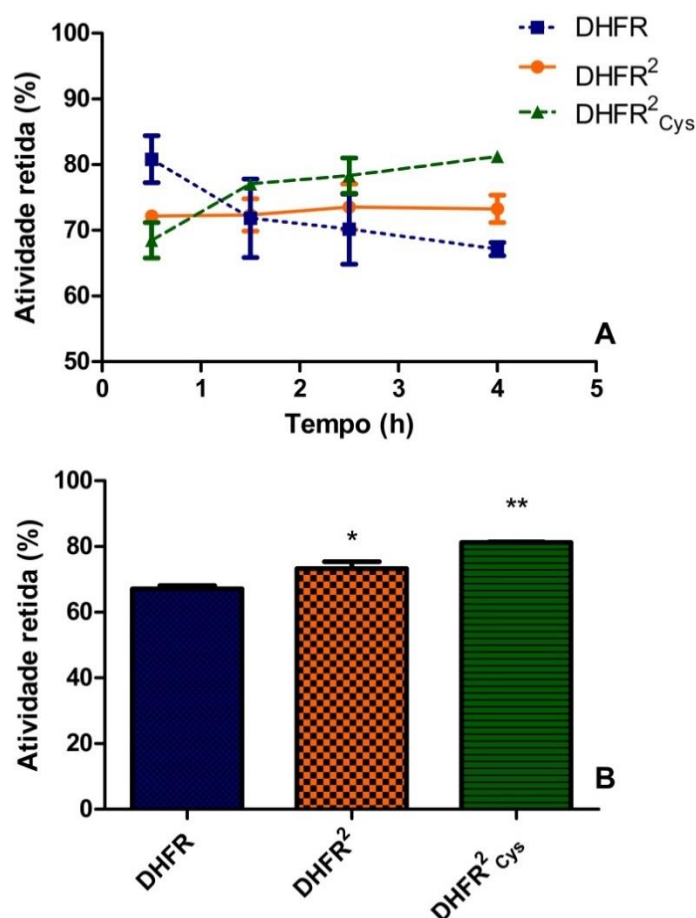


FIGURA 51 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA RETIDA DURANTE (A) E APÓS 4 HORAS (B) DE RECIRCULAÇÃO DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA PELA COLUNA DE EPOXISÍLICA  
 NOTA: Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  DP (n=3). B) \* $p < 0,05$  comparado a DHFR e a DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>; \*\* $p < 0,0001$  comparado a DHFR; \*\* $p < 0,05$  comparado a DHFR<sup>2</sup>.

### 5.3.2.2 Atividade e estabilidade dos reatores enzimáticos

A determinação da atividade do reator enzimático também foi baseada na reação característica de oxidação do cofator NADPH durante a conversão de DHF para THF catalisada pela DHFR (Mathews & Huennekens, 1963; Williams &

Morrison, 1992). Esta reação pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorvância a 340 nm causado pelo consumo do NADPH.

Para tanto, NADPH (50  $\mu$ M) foi injetado nos IMER primeiro na ausência e depois na presença de DHF (25  $\mu$ M). O pico do NADPH no tempo de retenção de 1 min (Figura 52-A) foi identificado pelo seu espectro de absorção UV característico (Figura 53) para todos os IMER. Quando na presença de DHF, a atividade da coluna foi avaliada qualitativa e quantitativamente pela redução da área do pico de NADPH, caracterizando consumo do mesmo durante a conversão de DHF para THF pela enzima imobilizada (Figura 52-B).

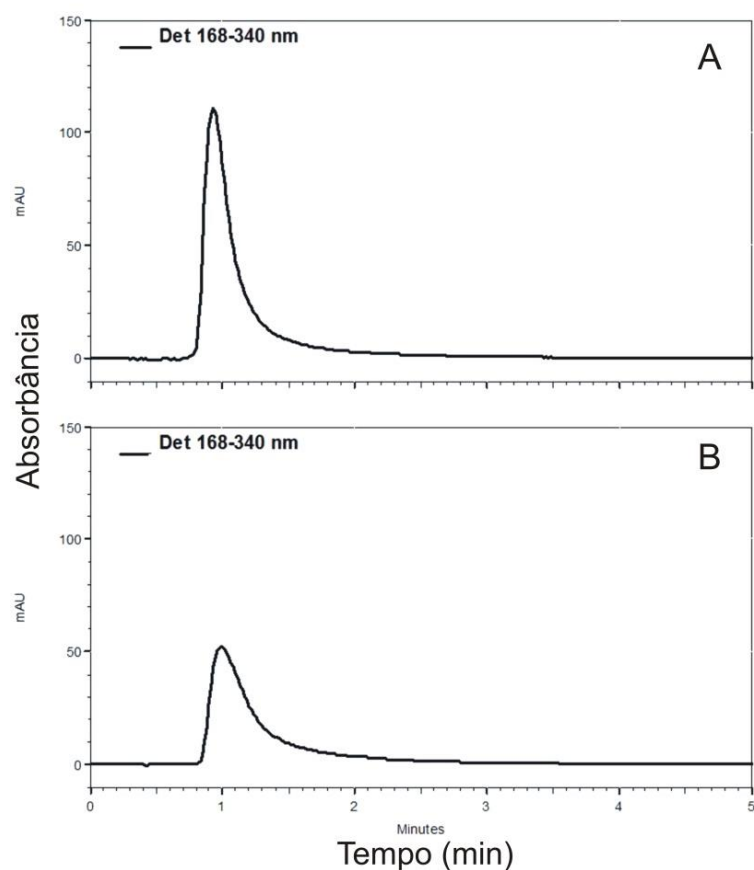


FIGURA 52 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS INJEÇÃO DE NADPH NA AUSÊNCIA (A) E NA PRESENÇA (B) DE DHF NO REATOR DE DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> IMOBILIZADA

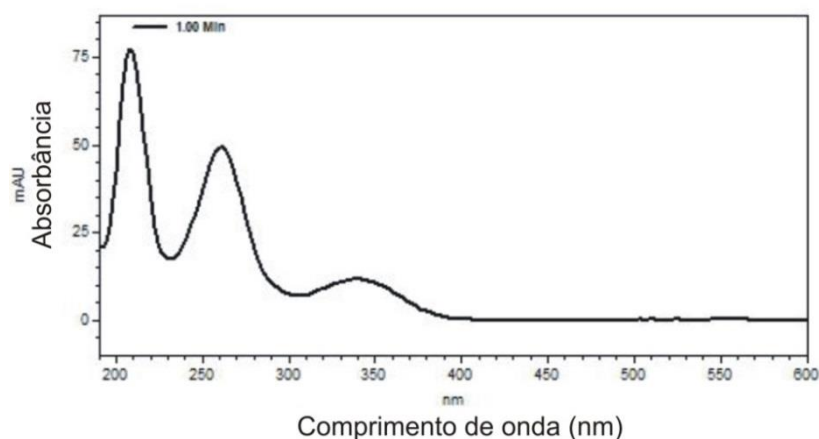


FIGURA 53 – ESPECTRO UV DO NADPH

Como a razão molar da reação catalisada pela DHFR é 1NADPH:1DHF e a proporção injetada nos reatores foi de 2NADPH:1DHF, o consumo teórico esperado do cofator NADPH pela enzima imobilizada seria próximo a 50% da concentração inicial quando o substrato é inteiramente consumido. Porém, a porcentagem observada de NADPH consumido pela DHFR, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada foi de 31,12 ± 3,42, 40,00 ± 4,06 e 50,41 ± 0,64, respectivamente (Figura 54). Este resultado indica que nos reatores de DHFR e de DHFR<sup>2</sup> parte das moléculas de DHF não teve acesso ao sítio ativo da enzima imobilizada, e com isso o consumo de NADPH foi menor do que o valor teórico esperado.

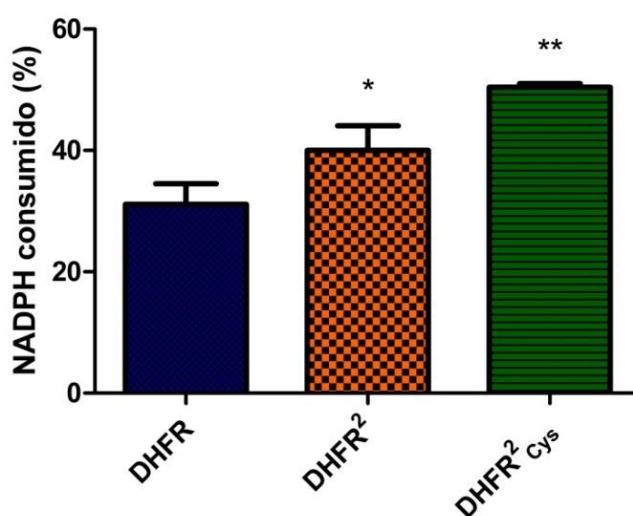


FIGURA 54 – ATIVIDADE CATALÍTICA DOS REATORES DE ENZIMA IMOBILIZADA  
 NOTA: Resultados apresentados como porcentagem (%) de NADPH consumida após injeção de NADPH 50 µM e DHF 25 µM nos reatores. Valores expressos como a média ± DP (n=3; \**p*<0,05 comparado a DHFR e a DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>; \*\**p*<0,0001 comparado a DHFR; \*\**p*<0,05 comparado a DHFR<sup>2</sup>).

Sabe-se que a imobilização produz alterações na estrutura e mobilidade enzimática, o que pode resultar em alteração das propriedades da enzima, como atividade, seletividade e especificidade. Esses efeitos podem ser imprevisíveis e relacionados com a região da enzima envolvida na imobilização (Barbosa et al., 2013). Os resultados de atividade enzimática dos IMER, e também os obtidos para teor de proteína imobilizada e de atividade retida durante a imobilização, podem ser diretamente explicados por essa teoria, considerando a diferença estrutural das três formas enzimáticas (Figura 55). Os dois dímeros, DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>, apresentaram imobilização mais eficiente e IMER mais ativos que o monômero DHFR. Isso sugere que a cadeia de aminoácidos entre as duas unidades da enzima e o aumento da estrutura proteica confere maior número de sítios disponíveis para serem ligados aos grupos epoxi do suporte, favorecendo a taxa de imobilização proteica. Além disso, a cadeia de aminoácidos melhora a flexibilidade da enzima no interior da coluna, aumentando as formas pelas quais a enzima pode se ligar ao suporte, como apresentado na figura 55. Isto diminui a chance de ocorrência de impedimento estérico do substrato ao sítio ativo enzimático causado pela ligação da enzima próximo ao mesmo, conduzindo à obtenção de IMER mais ativos. É coerente considerar que se o dímero é imobilizado no suporte através da cadeia de aminoácidos entre as duas unidades de DHFR, ou através de outro grupo distante do sítio ativo, é uma garantia de que o sítio ativo enzimático permanecerá disponível para se ligar a molécula de substrato. Por outro lado, se a imobilização enzimática ocorre próxima ou propriamente no sítio ativo, a atividade enzimática pode ser prejudicada. Esta última condição é mais provável de ocorrer no monômero DHFR (Barbosa et al., 2013).

No caso da DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>, em adição a cadeia de aminoácidos entre as duas unidades DHFR, existe ainda o grupo cisteína terminal, o qual contribui positivamente à imobilização enzimática principalmente pela sua alta reatividade e fácil formação de ligações em condições brandas. Estudos anteriores provaram que o grupo SH da cisteína terminal é o mais reativo da enzima, superando até mesmo a reatividade das duas cisteínas de ocorrência natural na DHFR, principalmente pelo aumento da área superficial de contato do grupo SH com o meio externo (Iwakura & Kokubu, 1993; Thongpanchang et al., 2007). Com isso, reações regio-seletivas ocorrem entre a cisteína terminal e os grupos epoxi do suporte, e grande parte da



enzima dentro da coluna fica igualmente disposta. Isso previne a ocorrência de ligações próximas ao sítio ativo enzimático, conduzindo a IMER com maior atividade catalítica. Os resultados encontrados estão de acordo com esta teoria, já que a atividade do reator de  $\text{DHFR}^2_{\text{Cys}}$  superou aquela apresentada pelo reator de  $\text{DHFR}^2$ . E os resultados de retenção de proteína e de atividade enzimática estão também coerentes com estes de atividade dos reatores enzimáticos, já que quanto maior a quantidade de enzima imobilizada e atividade retida da solução enzimática durante a imobilização, mais ativo é o reator obtido.

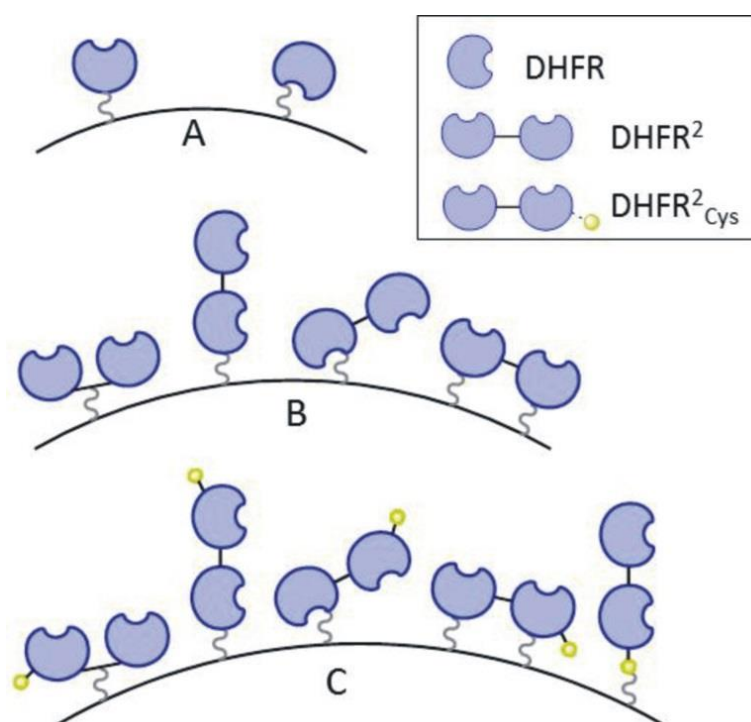


FIGURA 55 – ESQUEMA APRESENTANDO AS DIFERENÇAS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS DHFR (A),  $\text{DHFR}^2$  (B) E  $\text{DHFR}^2_{\text{Cys}}$  (C) E AS POSSIBILIDADES DE IMOBILIZAÇÃO DAS MESMAS EM EPOXISÍLICA

NOTA: Linhas cinza e preta (semi-círculo) representam a epoxisílica.

Contudo, a manutenção desta atividade é uma característica importante do reator de enzima imobilizada. Por isso, a longevidade dos IMER foi avaliada num estudo de estabilidade, com a atividade dos mesmos sendo determinada em intervalos de tempo dentro de 30 dias.

A figura 56 mostra os resultados de estabilidade obtidos para os IMER das três formas enzimáticas. Todos eles foram estáveis por pelo menos 30 dias nas condições de armazenamento (Figura 56-A), mesmo comportamento apresentado

pelas enzimas na forma livre (Figura 56-B). Pode-se concluir, então, que a imobilização das diferentes formas enzimáticas não alterou a estabilidade biológica da enzima, e que os IMER podem ser usados em suas diversas aplicações por pelo menos este período de tempo sem perda de atividade.

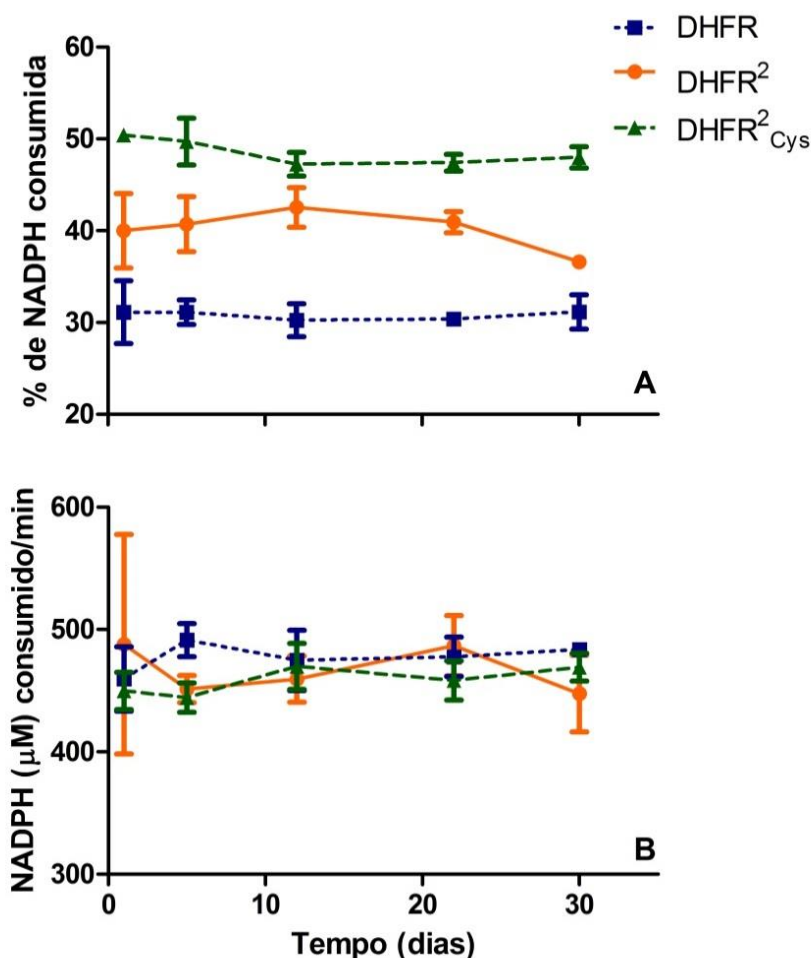


FIGURA 56 – ESTABILIDADE DOS IMER (A) E DAS ENZIMAS LIVRES (B) ARMAZENADAS A 4 °C EM TAMPÃO FOSFATO 10 mM pH 7,0 CONTENDO 0,01% (m/v) DE AZIDA SÓDICA  
NOTA: Cada ponto representa a média ± DP (n=3).

### 5.3.3 Aplicação do reator de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada

Sistemas de proteínas imobilizadas também podem ser desenvolvidos para facilitar e melhorar os procedimentos de purificação de macromoléculas biologicamente ativas. O sistema (estrepto) avidina-biotina em cromatografia de afinidade, por exemplo, foi originalmente desenvolvido para este propósito, além de

trazer vantagens em outras áreas de interesse (Bayer & Wilchek, 1990). Esta tecnologia é baseada no complexo de ligação extremamente forte entre a (estrepto) avidina e a biotina, e a ideia geral desta técnica é que a biotina ligada a moléculas com baixa ou alta massa molecular ainda reconhece a (estrepto) avidina. Neste contexto, métodos de biotilação de membranas, ácidos nucleicos, anticorpos e outras proteínas tem sido desenvolvidos, e a molécula biotinilada resultante pode ser retida por um suporte sólido no qual (estrepto) avidina foi imobilizada (Morag et al., 1996; Turkova, 1999; Wilchek & Bayer, 1999; Wilchek et al., 2006). Um estudo anterior se dedicou ao desenvolvimento de um sistema avidina-biotina para o isolamento de receptores hormonais, como os de insulina, usando uma coluna de bioafinidade de avidina, no qual o hormônio biotinilado acoplado ao seu receptor poderia se retido (Finn & Hofmann, 1990). Porém, uma das maiores desvantagens do uso de colunas de (estrepto) avidina para a purificação de um material marcado com biotina é a natureza quase irreversível do complexo (estrepto) avidina-biotina. Para romper esta ligação condições desnaturantes extremas são necessárias, as quais, na maioria dos casos, tornam impossível a completa regeneração da coluna de afinidade e recuperação do ligante biotinilado ativo (Bayer & Wilchek, 1978; Morag et al., 1996).

Com isso, novos sistemas que funcionem de forma similar ao complexo (estrepto) avidina- biotina, mas com constante de afinidade mais baixa que permita a retenção suficiente do analito e a subsequente recuperação da coluna e do material marcado sobre condições brandas, seriam ferramentas úteis para purificação de macromoléculas.

Neste trabalho, avaliou-se o potencial do reator de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> de ser aplicado na purificação de macromoléculas marcadas com ligantes fortes, como MTX ou bis-MTX. Bis-MTX consiste em um dímero de MTX (Carlson et al., 2003), usado amplamente na preparação de polígonos ou nanoanéis de proteína estáveis e homogêneos, que podem ser aplicados na engenharia de tecidos e na entrega orientada de drogas dentro do organismo (*targeted drug delivery*) (Chou et al., 2008). Este dímero apresenta-se acoplado a um terceiro ligante contendo um grupo maleimida terminal, o qual pode se ligar a outras macromoléculas de interesse, como ácidos nucleicos sintéticos usados no tratamento de patologias, permitindo o uso de bis-MTX na terapia orientada (Fegan et al., 2010; Gangar et al., 2012;

Gangar et al., 2013). A figura 57 apresenta um modelo do uso desta molécula na nanofarmacoterapia. Com isso, é de interesse em estudos de biologia molecular métodos para purificação de macromoléculas marcadas com bis-MTX, visto que podem facilitar o preparo e obtenção de nanoespécies.

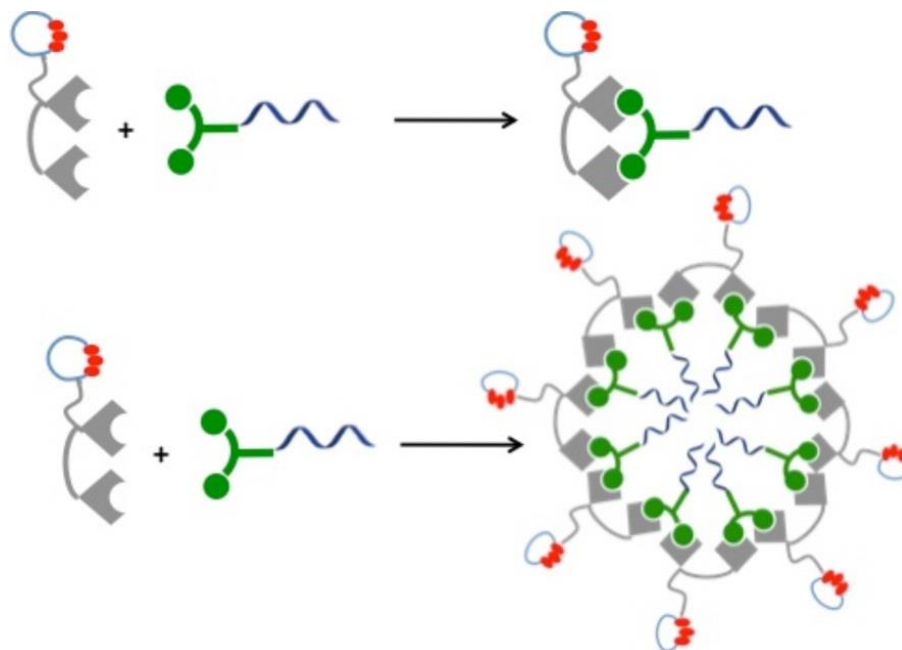


FIGURA 57 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DE NANOESTRUTURAS MONOMÉRICAS (ACIMA) E MULTIMÉRICAS (ABAIXO) FUNCIONALIZADAS COM OLIGONUCLEOTÍDEO

NOTA: Bis-MTX (verde) está ligado a um oligonucleotídeo de sentido invertido (azul) usado no tratamento de leucemia. DHFR<sup>2</sup> (cinza) está ligado a um peptídeo antiCD3 (círculo azul com três bolas vermelhas). A nanoestrutura formada, quando em contato com células leucêmicas, liga-se especificamente nos receptores de superfície celular CD3 através do peptídeo antiCD3 e é internalizada. Dentro da célula, o oligonucleotídeo pode exercer sua ação antitumoral.

FONTE: GANGAR *et al.* (2013).

Como o IMER de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> apresentou os melhores resultados de imobilização, foi o escolhido para esta aplicação. Este teste foi realizado para avaliar se moléculas de MTX e de bis-MTX podem ser retidas fortemente e depois liberadas em condições brandas de forma controlada da coluna enzimática, o que pode ser explorado na purificação de macromoléculas marcadas, como ocorre para o complexo (estrepto) avidina- biotina. MTX, um inibidor competitivo da DHFR (K<sub>d</sub>=0,04 nM) com um máximo de absorção em 302 nm, deve se ligar fortemente a DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada, assim como ocorre com a enzima livre, e o mesmo comportamento é esperado para o bis-MTX (Volpato et al., 2009).

Em acordo com a teoria, o IMER perdeu sua capacidade catalítica após duas injeções de MTX 50  $\mu\text{M}$ , que foi completamente retido pela coluna por ligação direta com o sítio ativo da enzima imobilizada. Por outro lado, bis-MTX foi injetado mais vezes para a saturação da coluna ser atingida (Figura 58), pois somente cerca de 75% da quantidade injetada foi retida em cada injeção. Esta porcentagem de retenção foi calculada pela diferença na área do pico de bis-MTX 50  $\mu\text{M}$  a 302 nm quando injetado no sistema com e sem a coluna enzimática. A saturação da coluna com bis-MTX foi atingida após injeção de 150  $\mu\text{M}$  desta substância, quando a coluna não apresentou mais atividade.

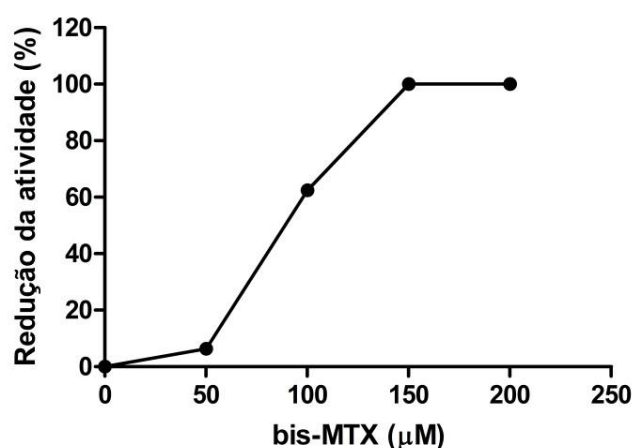


FIGURA 58 – REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA COLUNA DE DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> DURANTE INJEÇÕES DE BIS-MTX

MTX e bis-MTX foram, então, especificamente retidos na coluna, e a ligação forte entre os mesmos e a coluna enzimática pode ser explorada na retenção de estruturas acopladas a estas moléculas, como acontece para o sistema (estrepto) avidina- biotina. Porém, uma maneira de desligar estas moléculas de forma branda, tornando a coluna novamente disponível para um novo teste é requerida. Para atender esta necessidade, a liberação de MTX e bis-MTX da coluna foi realizada com TMP em tampão com alto teor salino. TMP é um inibidor reversível da DHFR ( $K_d=0,08$  nM) (Goodey et al., 2011) que, em concentrações mais altas que MTX, compete e desliga o mesmo do sítio ativo da DHFR devido a diferença pequena entre seus valores de  $K_d$ . Alto teor de sal foi usado nesta etapa e em outras subsequentes para prevenir interações não específicas entre as espécies químicas e a coluna. O progresso da eluição de MTX e de bis-MTX da coluna foi acompanhado

a 302 nm. TMP possui baixa absorção nesta região, permanecendo constante em cerca de 2 mAU quando na concentração de 2  $\mu$ M na fase móvel (Figura 59-A). Um aumento da absorção nesta região foi causado pela eluição do MTX (Figura 59-B) e de bis-MTX (Figura 59-C) do reator, o que pode ser confirmado pelas alterações características no espectro UV (Figura 60).

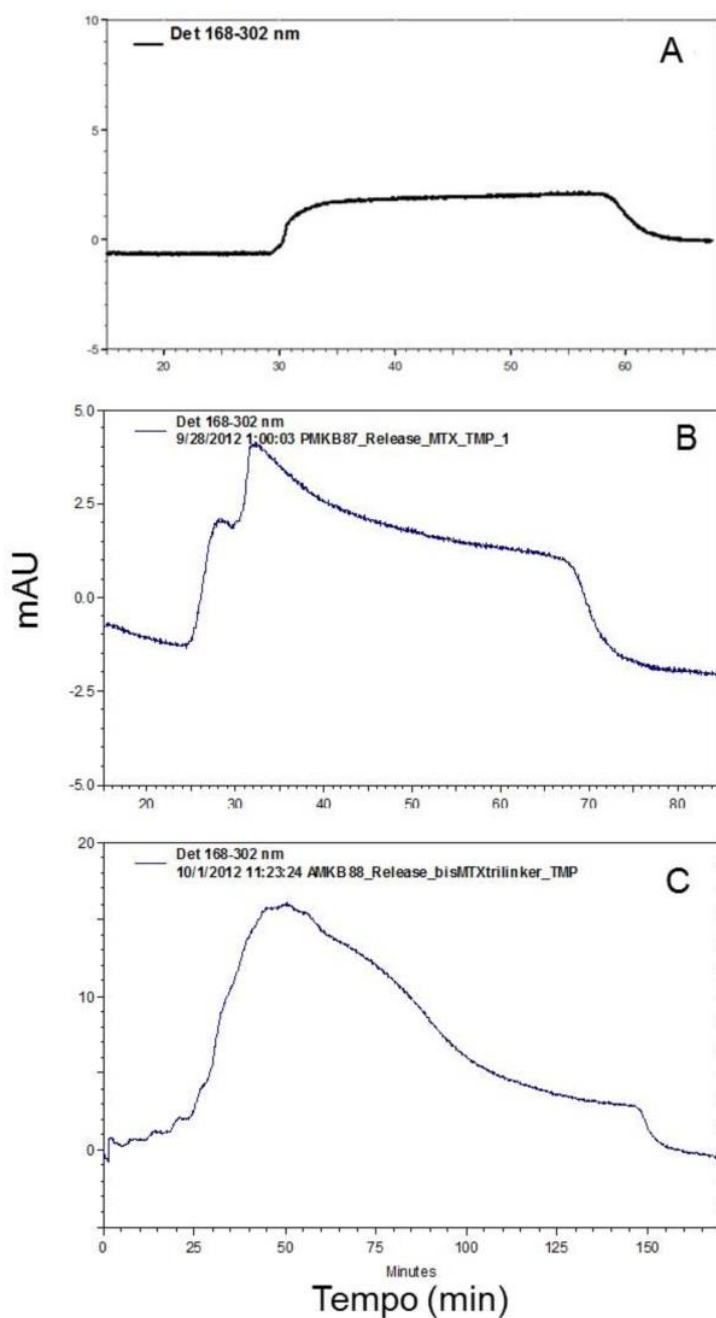


FIGURA 59 – ABSORÇÃO DA TRIMETOPRIMA 2  $\mu$ M A 302 NM (A). ELUIÇÃO DE MTX (B) E DE BIS-MTX (C) DA COLUNA DE DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>, OBSERVADA A 302 NM

Através da figura 59 é possível verificar que TMP foi capaz de desligar o MTX e o bis-MTX da coluna enzimática, e após estes terem sido eluídos completamente do reator, a linha de base do cromatograma retornou àquela correspondente a absorção da TMP. A coluna foi então lavada com tampão salino até nenhum sinal de TMP. Esta etapa propõe que a coluna de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> imobilizada pode ser usada para retenção de moléculas marcadas com MTX e bis-MTX, e que a liberação das espécies é facilmente realizada em condições suaves e controladas por competição com TMP.

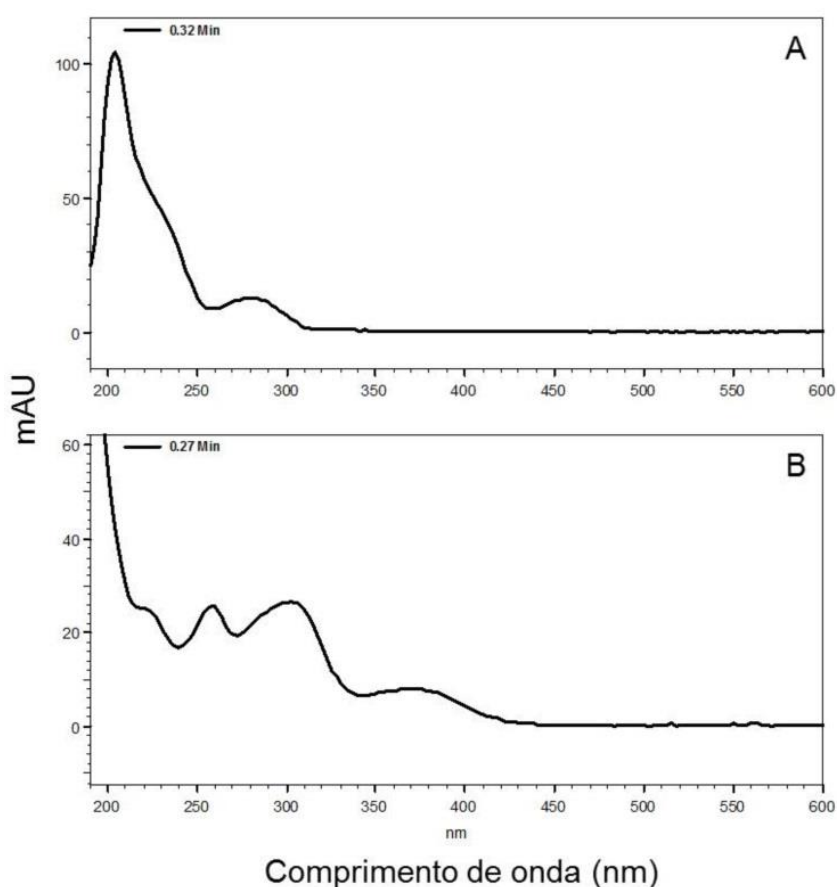


FIGURA 60 – ESPECTRO UV DA TRIMETOPRIMA (A) E DO METOTREXATO (B)

A próxima etapa foi a regeneração da coluna, já que esta permaneceu inativa após eluição com TMP, a qual manteve-se ligada ao sítio ativo da enzima imobilizada por ser um ligante forte. Para remover a TMP, tampão com alta concentração de folato foi passado pela coluna. Folato é um substrato da DHFR que em altas concentrações consegue competir com a TMP pelo sítio ativo enzimático,

desligando-a da coluna. Como o folato possui um  $K_d$  na ordem de  $\mu\text{M}$  é fracamente ligado a  $\text{DHFR}^2_{\text{Cys}}$ , e seu excesso é facilmente removido pelo tampão. Com isso, eluição com folato foi seguido de lavagem e condicionamento da coluna com tampão fosfato. Após este processo, a coluna estava regenerada e teve sua atividade recuperada, indicando que o sítio ativo da enzima imobilizada estava novamente livre para uma nova série de experimentos.

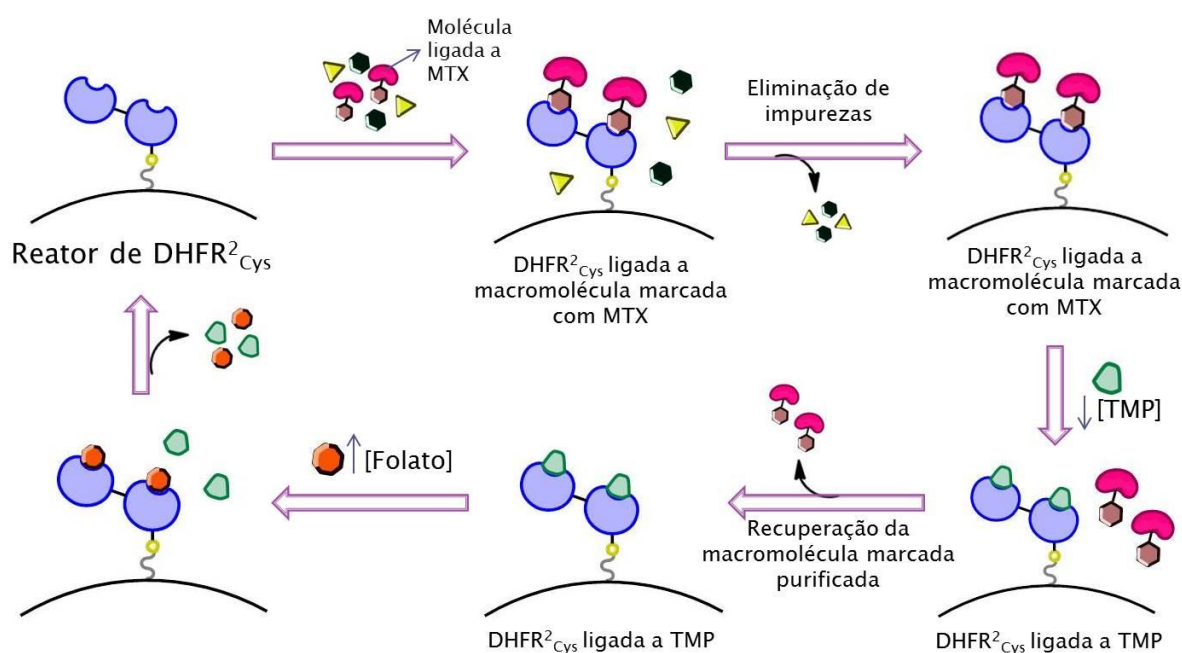


FIGURA 61 – ESQUEMA REPRESENTANDO A PURIFICAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS MARCADAS COM METOTREXATO (MTX) PELO REATOR DE  $\text{DHFR}^2_{\text{Cys}}$  IMOBILIZADA  
NOTA: TMP – trimetoprima.

Alguns experimentos foram previamente realizados e mostraram que folato em altas concentrações é também capaz de remover o MTX e o bis-MTX da coluna enzimática, sem necessidade da etapa de eluição com TMP. Porém, na concentração usada (1 mM), o folato possui absorção muito alta a 302 nm, interferindo na monitorização da eluição do MTX e bis-MTX, e impossibilitando a visualização da eluição dos mesmos da coluna. Além disso, uma alta concentração de folato estaria presente na solução coletada da coluna contendo o analito marcado de interesse, o que tornaria mais difícil a purificação da amostra. Por outro lado, se TMP é usado em baixa concentração para remover o analito de interesse da coluna, o processo de eluição pode ser monitorado, e a amostra coletada irá conter um baixo teor de TMP, facilitando a purificação.



Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que o IMER de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> é uma ferramenta com potencial para ser aplicada na retenção de macromoléculas acopladas a MTX ou bis-MTX, e ser usada para a purificação das mesmas da mesma forma proposta para o sistema de cromatografia por afinidade (estrepto) avidina- biotina. Em condições brandas, ambos os ligantes foram retidos e depois liberados da coluna de DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub>, o que permite a recuperação das moléculas de interesse e o reuso da coluna seguindo condições pré-estabelecidas de lavagem. A figura 61 resume o processo proposto. Experimentos com macromoléculas marcadas com MTX ou bis-MTX estão em andamento e a otimização das condições está sendo encorajada, com resultados promissores.

É interessante observar que cromatografia por afinidade em coluna de MTX é extensivamente usada para purificação da DHFR (Baccanari et al., 1975; Evenson et al., 1996; Ghosh et al., 2008) pela baixa constante de dissociação do MTX e forte interação com a enzima. Este princípio de ligação foi aplicado na ordem inversa neste trabalho, tendo a enzima imobilizada ao invés do MTX nos IMER de DHFR. Isto abre uma gama muito maior de aplicações, e a ferramenta pode ser facilmente otimizada para selecionar e purificar qualquer estrutura contendo MTX ou bis-MTX, como demonstrado nos experimentos práticos. Além disso, entre outras aplicações, as colunas com enzima imobilizada também podem ser aplicadas para triagem de inibidores da DHFR, já que a descoberta de novos agentes antitumorais, antibacterianos e antimaláricos é oportuna. Substâncias sintéticas ou de origem natural podem ser injetadas na coluna usando o mesmo procedimento usado para o MTX, e o potencial inibidor das mesmas pode ser determinado pela redução da atividade enzimática. O mesmo procedimento de remoção do MTX e bis-MTX da coluna poderia ser otimizado para liberar qualquer outro inibidor forte. Assim, uma maneira de recuperar o inibidor, o qual pode ser posteriormente purificado e identificado, e regenerar o IMER é proposto. O grupo de pesquisa mantém esta, dentre outras aplicações, como um dos objetivos futuros do projeto.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, reatores de enzimas imobilizadas foram desenvolvidos com diferentes enzimas, e aplicações distintas desta técnica foram realizadas. A detecção da atividade enzimática dos reatores foi realizada tanto por determinação da formação do produto dopacromo no caso da tirosinase, como do consumo do cofator enzimático NADPH no caso da DHFR.

Para o desenvolvimento dos reatores de tirosinase, a extração da enzima de *A. bisporus* foi primeiramente otimizada por meio de técnicas de purificação de proteínas e por planejamento fatorial de experimentos, e a imobilização da tirosinase pela técnica *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas foi a melhor técnica encontrada para o desenvolvimento dos IMER. O reator de tirosinase foi, então, eficientemente testado para triagem de inibidores enzimáticos, os quais podem ser explorados no tratamento de patologias associadas a hiperpigmentação e para a prevenção do escurecimento enzimático de alimentos, sendo este o primeiro trabalho de desenvolvimento de IMER de tirosinase para esta aplicação.

Para os reatores de DHFR, a forma monomérica da enzima DHFR e suas formas diméricas DHFR<sup>2</sup> e DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> foram purificadas de culturas de *E. coli*, e imobilizadas *in situ* em epoxisílica sintetizada por micro-ondas. O reator da forma DHFR<sup>2</sup><sub>Cys</sub> foi o que apresentou os melhores resultados com relação a capacidade de imobilização enzimática e atividade catalítica final. Com isso, este reator teve seu potencial de aplicação na purificação de macromoléculas marcadas com MTX ou com ligante de bis-MTX testado, com resultados promissores. Este é o primeiro trabalho que relata o desenvolvimento de IMER de DHFR, sendo a aplicação dos reatores para purificação de macromoléculas inédita.

Em geral, este trabalho apresentou aplicações pontuais dos reatores de enzimas imobilizadas e demonstrou o caráter multifuncional dos mesmos. Os reatores desenvolvidos neste trabalho também podem ser explorados em outras áreas de interesse, como na biocatálise de substâncias orgânicas catalisada pela tirosinase e na triagem de inibidores da DHFR.

## REFERÊNCIAS

- Ahmed F, Dunlap RB 1984a. Kinetic studies of Sepharose - and CH-Sepharose-immobilized dihydrofolate reductase. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1227-1232.
- Ahmed F, Dunlap RB 1984b. Preparation of (-)-5,6,7,8-tetrahydrofolate using immobilized dihydrofolate reductase. *Analytical Biochemistry* 141: 149-154.
- Akyilmaz E, Yorganci E, Asav E 2010. Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution. *Bioelectrochemistry* 78: 155-160.
- Amer M, Metwalli M 1998. Topical hydroquinone in the treatment of some hyperpigmentary disorders. *International Journal of Dermatology* 37: 449-450.
- Andersson SE, Johansson LH, Lexmüller K, Ekström GM 2000. Anti-arthritic effect of methotrexate: Is it really mediated by adenosine? *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9: 333-343.
- Andrisano V, Bartolini M, Gotti R, Cavrini V, Felix G 2001. Determination of inhibitors' potency (IC<sub>50</sub>) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753: 375-383.
- Annis DA, Athanasopoulos J, Curran PJ, Felsch JS, Kalghatgi K, Lee WH, Nash HM, Orminati JPA, Rosner KE, Shipps Jr GW, Thaddupathy GRA, Tyler AN, Vilenchik L, Wagner CR, Wintner EA 2004. An affinity selection-mass spectrometry method for the identification of small molecule ligands from self-encoded combinatorial libraries: Discovery of a novel antagonist of E. coli dihydrofolate reductase. *International Journal of Mass Spectrometry* 238: 77-83.
- Antiochia R, Vinci G, Gorton L 2013. Rapid and direct determination of fructose in food: A new osmium-polymer mediated biosensor. *Food Chemistry* 140: 742-747.
- Apetrei C, Rodriguez-Mendez ML, De Saja JA 2011. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochim. Acta* 56: 8919-8925.
- Arndt KA, Fitzpatrick TB 1965. Topical use of hydroquinone as a depigmenting agent. *Journal of the American Medical Association* 194: 965-967.
- Atlow SC, Bonadonnaaparo L, Klibanov AM 1984. Dephenolization of Industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 599-603.
- Baccanari D, Phillips A, Smith S, Sinski D, Burchall J 1975. Purification and properties of Escherichia-coli dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 14: 5267-5273.
- Badreshia-Bansal S, Draelos ZD 2007. Insight into skin lightening cosmeceuticals for women of color. *Journal of drugs in dermatology : JDD* 6: 32-39.
- Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R 2013. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules*.
- Bartolini M, Greig NH, Yu QS, Andrisano V 2009. Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. *Journal of Chromatography A* 1216: 2730-2738.

- Bayer EA, Wilchek M 1978. Emerging Techniques - Avidin-Biotin complex as a tool in molecular biology. *Trends Biochem.Sci.* 3: N257-N259.
- Bayer EA, Wilchek M 1990. Application of Avidin Biotin technology to affinity-based separations. *Journal of chromatography* 510: 3-11.
- Bertucci C, Bartolini M, Gotti R, Andrisano V 2003. Drug affinity to immobilized target bio-polymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 797: 111-129.
- Besanger TR, Chen Y, Deisingh AK, Hodgson R, Jin W, Mayer S, Brook MA, Brennan JD 2003. Screening of inhibitors using enzymes entrapped in sol-gel-derived materials. *Analytical Chemistry* 75: 2382-2391.
- Blakley RL 1960. Crystalline Dihydropteroylglutamic Acid. *Nature* 188: 231-232.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bucks DAW, McMaster JR, Guy RH, Maibach HI 1988. Percutaneous absorption of hydroquinone in humans: Effect of 1-dodecylazacycloheptan-2-one (azone) and the 2-ethylhexyl ester of 4-(dimethylamino)benzoic acid (escalol 507). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 24: 279-289.
- Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46: 982-985.
- Calleri E, Marrubini G, Massolini G, Lubda D, de Fazio SS, Furlanetto S, Wainer IW, Manzo L, Caccialanza G 2004a. Development of a chromatographic bioreactor based on immobilized beta-glucuronidase on monolithic support for the determination of dextromethorphan and dextrophan in human urine. *J Pharm Biomed Anal* 35: 1179-1189.
- Calleri E, Temporini C, Gasparrini F, Simone P, Villani C, Ciogli A, Massolini G 2011. Immobilized trypsin on epoxy organic monoliths with modulated hydrophilicity: Novel bioreactors useful for protein analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 8937-8945.
- Calleri E, Temporini C, Massolini G, Caccialanza G 2004b. Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35: 243-258.
- Cardoso CL, de Moraes MC, Cass QB 2009. Immobilization of the Enzymes on Chromatographic Supports: A Tool to Research of Inhibitor Compounds. *Quimica Nova* 32: 175-187.
- Carlson JC, Jena SS, Flenniken M, Chou TF, Siegel RA, Wagner CR 2006. Chemically controlled self-assembly of protein nanorings. *J Am Chem Soc* 128: 7630-7638.
- Carlson JC, Kanter A, Thuduppathy GR, Cody V, Pineda PE, McIvor RS, Wagner CR 2003. Designing protein dimerizers: the importance of ligand conformational equilibria. *J Am Chem Soc* 125: 1501-1507.
- Chang TS 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10: 2440-2475.
- Chou TF, So C, White BR, Carlson JC, Sarikaya M, Wagner CR 2008. Enzyme nanorings. *ACS Nano* 2: 2519-2525.

- Cloix J-F, Wainer IW 2001. Development of an immobilized brain glutamine synthetase liquid chromatographic stationary phase for on-line biochemical studies. *Journal of Chromatography A* 913: 133-140.
- Cooper GM (2000) The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. In: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Copeland RA 2005. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: a Guide for medicinal chemists and pharmacologists*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Crosfield J, Sons 1992. Chemical Reactions using Microwave Technology. World Intellectual Property Organization, WO 92/00806.
- Czekster CM, Vandemeulebroucke A, Blanchard JS 2011. Two parallel pathways in the kinetic sequence of the dihydrofolate reductase from mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* 50: 7045-7056.
- D'Souza L, Warwick PE, Freisheim JH 1972. Purification and properties of dihydrofolate reductase from an amethopterin-resistant strain of *Streptococcus faecium*. *Biochemistry* 11: 1528-1534.
- Daw NC, Billups CA, Rodriguez-Galindo C, McCarville MB, Rao BN, Cain AM, Jenkins JJ, Neel MD, Meyer WH 2006. Metastatic osteosarcoma: Results of two consecutive therapeutic trials at St. Jude Children's Research Hospital. *Cancer* 106: 403-412.
- Dawson RMC, Elliot DC, Jones KM 1984. *Data for Biochemical Research*. Oxford: Oxford Science Publications.
- Decker H, Schweikardt T, Tuczek F 2006. The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered? *Angew. Chem. Int.* 45: 4546-4550.
- Deeth RJ, Diedrich C 2010. Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15: 117-129.
- Ditzler LR, Sen A, Gannon MJ, Kohen A, Tivanski AV 2011. Self-assembled enzymatic monolayer directly bound to a gold surface: Activity and molecular recognition force spectroscopy studies. *Journal of the American Chemical Society* 133: 13284-13287.
- Donato L, Algieri C, Miriello V, Mazzei R, Clarizia G, Giorno L 2012. Biocatalytic zeolite membrane for the production of L-DOPA. *J. Membr. Sci.* 407: 86-92.
- Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci* 10: 4066-4087.
- Ensuncho L, Alvarez-Cuenca M, Legge RL 2005. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27: 185-191.
- Erickson JS, Mathews CK 1973. Dihydrofolate reductases of *Escherichia coli* and bacteriophage T4. A spectrofluorometric study. *Biochemistry* 12: 372-380.
- Espin JC, Varon R, Fenoll LG, Gilabert MA, Garcia-Ruiz PA, Tudela J, Garcia-Canovas F 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur J Biochem* 267: 1270-1279.
- Espín JC, Wichers HJ 2001. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1544: 289-300.
- Evenson DA, Adams J, McIvor RS, Wagner CR 1996. Methotrexate resistance of mouse dihydrofolate reductase: effect of substitution of phenylalanine-31 by serine or tryptophan. *J Med Chem* 39: 1763-1766.

- Faber K 2004. *Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook*. New York: Springer-Verlag.
- Fegan A, White B, Carlson JC, Wagner CR 2010. Chemically controlled protein assembly: techniques and applications. *Chem Rev* 110: 3315-3336.
- Félix G, Descorps V 1999. Stereochemical resolution of racemates, in HPLC, using a chiral stationary phase based upon immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin. I. Structural chiral separations. *Chromatographia* 49: 595-605.
- Fenoll LG, Rodríguez-Lopez JN, García-Sevilla F, García-Ruiz PA, Varon R, García-Canovas F, Tudela J 2001. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. *Biochim Biophys Acta* 1548: 1-22.
- Finn FM, Hofmann K 1990. Isolation and characterization of hormone receptors. *Method Enzymol.* 184: 244-274.
- Agaricus bisporus*. FLICKR. 2013. Fotografia, color. Disponível em: [www.flickr.com](http://www.flickr.com). Acesso em 10/06/2013.
- Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cave A, Richomme P, Bruneton J 1994. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research* 8: 174-178.
- Fournet A, Ferreira ME, Rojas De Arias A, Torres De Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R 1996. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2- substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2447-2451.
- Frey KM, Viswanathan K, Wright DL, Anderson AC 2012. Prospective Screening of Novel Antibacterial Inhibitors of Dihydrofolate Reductase for Mutational Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 3556-3562.
- Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A 1998. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of Kojic acid. *Food and Chemical Toxicology* 36: 697-703.
- Gabrovskia K, Marinov I, Godjevargova T, Portaccio M, Lepore M, Grano V, Diano N, Mita DG 2008. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 339-345.
- Gangar A, Fegan A, Kumarapperuma SC, Huynh P, Benyumov A, Wagner CR 2013. Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides by Chemically Self-Assembled Nanostructures (CSANs). *Molecular pharmaceutics* 10: 3514-3518.
- Gangar A, Fegan A, Kumarapperuma SC, Wagner CR 2012. Programmable Self-Assembly of Antibody-Oligonucleotide Conjugates as Small Molecule and Protein Carriers. *Journal of the American Chemical Society* 134: 2895-2897.
- Gao DF, Zhang YJ, Yang CR, Chen KK, Jiang HJ 2008. Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia taliensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7517-7521.
- García-Molina F, Hiner ANP, Fenoll LG, Rodríguez-Lopez JN, García-Ruiz PA, García-Cánovas F, Tudela J 2005. Mushroom tyrosinase: Catalase activity, inhibition, and suicide inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3702-3709.

- Genova C, Rijavec E, Truini A, Coco S, Sini C, Barletta G, Dal Bello MG, Alama A, Savarino G, Pronzato P, Boccardo F, Grossi F 2013. Pemetrexed for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14: 1545-1558.
- Ghosh P, Cheng J, Chou TF, Jia Y, Avdulov S, Bitterman PB, Polunovsky VA, Wagner CR 2008. Expression, purification and characterization of recombinant mouse translation initiation factor eIF4E as a dihydrofolate reductase (DHFR) fusion protein. *Protein Expr Purif* 60: 132-139.
- Gillbro JM, Olsson MJ 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. *International journal of cosmetic science* 33: 210-221.
- Girelli AM, Mattei E 2005. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr. B* 819: 3-16.
- Girelli AM, Mattei E, Messina A 2006. Phenols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 580: 271-277.
- Girelli AM, Mattei E, Messina A 2007a. Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application - Development and characterization. *Sensors and Actuators B-Chemical* 121: 515-521.
- Girelli AM, Mattei E, Messina A, Papaleo D 2007b. Immobilization of mushroom tyrosinase on controlled pore glass: Effect of chemical modification. *Sensors and Actuators B: Chemical* 125: 48-54.
- Girelli AM, Mattei E, Papaleo D 2009. Tyrosinase immobilized reactor as a fast tool for polyphenolic index of tea. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 709-713.
- Goodey NM, Herbert KG, Hall SM, Bagley KC 2011. Prediction of residues involved in inhibitor specificity in the dihydrofolate reductase family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1814: 1870-1879.
- Goodsell DS 1999. The molecular perspective: Methotrexate. *Stem Cells* 17: 314-315.
- Graham DG, Jeffs PW 1977. The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis. *J Biol Chem* 252: 5729-5734.
- Guazzaroni M, Crestini C, Saladino R 2012. Layer-by-Layer coated tyrosinase: An efficient and selective synthesis of catechols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 157-166.
- Guido RVC, Cardoso CL, de Moraes MC, Andricopulo AD, Cass QB, Oliva G 2010. Structural Insights into the Molecular Basis Responsible for the Effects of Immobilization on the Kinetic Parameters of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and Human. *J. Braz. Chem. Soc.* 21: 1845-1853.
- Gundersen LE, Dunlap RB, Harding NGL, Freisheim JH, Otting F, Huennekens FM 1972. Dihydrofolate reductase from amethopterin-resistant *Lactobacillus casei*. *Biochemistry* 11: 1018-1023.
- Haddad AL, Matos LF, Brunstein F, Ferreira LM, Silva A, Costa Jr D 2003. A clinical, prospective, randomized, double-blind trial comparing skin whitening complex with hydroquinone vs. placebo in the treatment of melasma. *International Journal of Dermatology* 42: 153-156.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 235-251.

- Helm CV, Coradin JH, Kestring DR 2009. Avaliação da Composição Química dos Cogumelos Comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. Embrapa, Colombo.
- Hodgson RJ, Besanger TR, Brook MA, Brennan JD 2005. Inhibitor screening using immobilized enzyme reactor chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 77: 7512-7519.
- Hoogduijn MJ, Cemeli E, Ross K, Anderson D, Thody AJ, Wood JM 2004. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res* 294: 60-67.
- Hopkins AL, Groom CR 2002. The druggable genome. *Nature reviews. Drug discovery* 1: 727-730.
- Huang Z, Wagner CR, Benkovic SJ 1994. Nonadditivity of mutational effects at the folate binding site of *Escherichia coli* dihydrofolate-reductase. *Biochemistry* 33: 11576-11585.
- Hyung JJ, Noda M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M 2006. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9827-9833.
- Interchim 2012. *EDTA and EGTA chelating agents*. <http://www.interchim.fr/ft/0/036291.pdf>, acesso em Janeiro de 2013.
- Invitrogen 2010. *One Shot® BL21(DE3), One Shot® BL21(DE3)pLysS, One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells*. [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21_man.pdf), acesso em Junho de 2012.
- Iqbal J, Iqbal S, Müller CE 2013. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis. *Analyst* 138: 3104-3116.
- Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida K, Fujita T 2004. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4893-4898.
- Iwakura M, Kokubu T 1993. Immobilization of dihydrofolate reductase by engineered cysteine residue attached to its C-terminal end. *J. Biochem.* 114: 339-343.
- Janssen AEM, Halling PJ 1994. Specificities of enzymes "corrected for solvation" depend on the choice of the standard state. *Journal of the American Chemical Society* 116: 9827-9830.
- Jeong SH, Ryu YB, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Baek YS, Kang JE, Lee WS, Park KH 2009. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1195-1203.
- Kagedal B, Konradsson P, Shibata T, Mishima Y 1995. High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Dopachrome and Dihydroxyphenylalanine. *Analytical Biochemistry* 225: 264-269.
- Kelly JW, Baldwin TO 1991. *Applications of Enzyme Biotechnology*. Texas: Springer.
- Kessel D, Roberts D 1965. Dihydrofolate reductase from *Lactobacillus leichmannii*. I. Purification and characterization. *Biochemistry* 4: 2631-2636.
- Khan AA, Akhtar S, Husain Q 2005. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support. *Process Biochemistry* 40: 2379-2386.
- Khan MTH 2012. Novel tyrosinase inhibitors from natural resources -Their computational studies. *Current Medicinal Chemistry* 19: 2262-2272.



- Kim YJ, Uyama H 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 1707-1723.
- Ko HH, Chang WL, Lu TM 2008. Antityrosinase and antioxidant effects of ent-kaurane diterpenes from leaves of *Broussonetia papyrifera*. *Journal of Natural Products* 71: 1930-1933.
- Kompis IM, Islam K, Then RL 2005. DNA and RNA synthesis: antifolates. *Chem Rev* 105: 593-620.
- Kong KH, Hong MP, Choi SS, Kim YT, Cho SH 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol Appl Biochem* 31 ( Pt 2): 113-118.
- Koskinen AMP, Klibanov AM 1996. *Enzymatic reactions on organic media*. London: Chapman and Hall.
- Křenková J, Foret F 2004. Immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Electrophoresis* 25: 3550-3563.
- Kubo I, Chen QX, Nihei KI 2003. Molecular design of antibrowning agents: Antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry* 81: 241-247.
- Kubo I, Kinst-Hori I, Kubo Y, Yamagiwa Y, Kamikawa T, Haraguchi H 2000. Molecular design of antibrowning agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1393-1399.
- Labus K, Turek A, Liesiene J, Bryjak J 2011. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. *Biochemical Engineering Journal* 56: 232-240.
- Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Boo YC, Hyun CG, Kim YS, Park D 2007. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Br J Dermatol* 157: 242-248.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM 2007. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Editora Savier.
- Li Q, Hapka D, Chen H, Vallera DA, Wagner CR 2008. Self-Assembly of Antibodies by Chemical Induction. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 47: 10179-10182.
- Li Q, So CR, Fegan A, Cody V, Sarikaya M, Vallera DA, Wagner CR 2010. Chemically Self-Assembled Antibody Nanorings (CSANs): Design and Characterization of an Anti-CD3 IgM Biomimetic. *J Am Chem Soc*.
- Liese A, Hilterhaus L 2013. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews* 42: 6236-6249.
- Lim JY, Ishiguro K, Kubo I 1999. Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytotherapy Research* 13: 371-375.
- Lima RS, Nunes GS, Noguer T, Marty JL 2007. Enzymatic biosensor for the detection of dithiocarbamate fungicides. Kinetic study of aldehyde dehydrogenase enzyme and biosensor optimization. *Química Nova* 30: 9-17.
- Lin JW, Chiang HM, Lin YC, Wen KC 2008. Natural products with skin - Whitening effects. *Journal of Food and Drug Analysis* 16: 1-10.
- Mangrulkar PA, Yadav R, Meshram JS, Labhsetwar NK, Rayalu SS 2012. Tyrosinase-Immobilized MCM-41 for the Detection of Phenol. *Water Air Soil Pollut.* 223: 819-825.
- Marin-Zamora ME, Rojas-Melgarejo F, Garcia-Canovas F, Garcia-Ruiz PA 2006. Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on D-sorbitol cinnamic ester. *Journal of Biotechnology* 126: 295-303.

- Marin-Zamora ME, Rojas-Melgarejo F, Garcia-Canovas F, Garcia-Ruiz PA 2009. Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology* 139: 163-168.
- Marín-Zamora ME, Rojas-Melgarejo F, García-Cánovas F, García-Ruiz PA 2005. Cinnamic ester of D-sorbitol for immobilization of mushroom tyrosinase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80: 1356-1364.
- Marshall MR 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*® 39: 1897-1901.
- Massolini G, Calleri E, De Lorenzi E, Pregnolato M, Terreni M, Félix G, Gandini C 2001. Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 921: 147-160.
- Mateo C, Fernandez-Lorente G, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM 2000. Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules* 1: 739-745.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1451-1463.
- Mathews CK, Huennekens FM 1963. Further studies on dihydrofolate reductase. *The Journal of biological chemistry* 238: 3436-3442.
- Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Serra S, Corda M, Fadda MB, Era B, Fais A 2012. Tyrosine-like condensed derivatives as tyrosinase inhibitors. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 64: 742-746.
- Mazzini F, Nuti E, Petri A, Rossello A 2011. Immobilization of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) for online drug screening. *Journal of Chromatography B* 879: 756-762.
- Moaddel R, Wainer IW 2007. Conformational mobility of immobilized proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43: 399-406.
- Morag E, Bayer EA, Wilchek M 1996. Immobilized nitro-avidin and nitro-streptavidin as reusable affinity matrices for application in avidin-biotin technology. *Analytical Biochemistry* 243: 257-263.
- Morrison JF, Stone SR 1988. Mechanism of the reaction catalyzed by dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*: pH and deuterium isotope effects with NADPH as the variable substrate. *Biochemistry* 27: 5499-5506.
- Nakagawa M, Kawai K 1995. Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis* 32: 9-13.
- Nast A, Kopp I, Augustin M, Banditt KB, Boehncke WH, Follmann M, Friedrich M, Huber M, Kahl C, Klaus J, Koza J, Kreiselmaier I, Mohr J, Mrowietz U, Ockenfels HM, Orzechowski HD, Prinz J, Reich K, Rosenbach T, Rosumeck S, Schlaeger M, Schmid-Ott G, Sebastian M, Streit V, Weberschock T, Rzany B 2007. German evidence-based guidelines for the treatment of Psoriasis vulgaris (short version). *Archives of Dermatological Research* 299: 111-138.
- Nguyen MHK, Nguyen HX, Nguyen MTT, Nguyen NT 2012. Phenolic constituents from the heartwood of *Artocarpus altilis* and their tyrosinase inhibitory activity. *Natural Product Communications* 7: 185-186.
- Nie YL, Wang WH 2009. Immobilized enzyme reactor in on-line LC and its application in drug screening. *Chromatographia* 69.
- Oefner C, D'Arcy A, Winkler FK 1988. Crystal structure of human dihydrofolate reductase complexed with folate. *Eur. J. Biochem.* 174: 377-385.

- Oliveira KB, Oliveira BH 2012. Obtenção de substâncias bioativas através de biotransformação de produtos naturais. *Revista Eletrônica de Farmácia IX*: 89-99.
- Oliveira KB, Palú E, Weffort-Santos AM, Oliveira BH 2013. Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16f10 cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23: 249-258.
- Orio M, Bochot C, Dubois C, Gellon G, Hardré R, Jamet H, Luneau D, Philouze C, Réglie M, Serratrice G, Belle C 2011. The versatile binding mode of transition-state analogue inhibitors of tyrosinase towards dicopper(ii) model complexes: Experimental and theoretical investigations. *Chemistry - A European Journal* 17: 13482-13494.
- Palumbo A, D'Ischia M, Misuraca G, Prota G 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1073: 85-90.
- Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C 2006. *Enzyme Technology*. New York: Springer.
- Pastore EJ, Plante LT, Kisliuk RL 1974. Pteroyllysine-agarose in the purification of dihydrofolate reductase. *Methods Enzymol.* 34: 281-288.
- Poe M, Greenfield NJ, Hirshfield JM, Williams MN, Hoogsteen K 1972. Dihydrofolate reductase. Purification and characterization of the enzyme from an amethopterin-resistant mutant of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 11: 1023-1030.
- Radhapyari K, Kotoky P, Das MR, Khan R 2013. Graphene-polyaniline nanocomposite based biosensor for detection of antimalarial drug artesunate in pharmaceutical formulation and biological fluids. *Talanta* 111: 47-53.
- Ramanan AV, Whitworth P, Baildam EM 2003. Use of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Archives of Disease in Childhood* 88: 197-200.
- Robertson JG 2005. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry* 44: 5561-5571.
- Saewan N, Koysomboon S, Chantrapromma K 2011. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 1018-1025.
- Sarkar C, Singh SK, Mandal SK, Saha B, Bera R, Ratha J, Datta PK, Bhadra R 2006. Human placental protein/peptides stimulate melanin synthesis by enhancing tyrosinase gene expression. *Mol Cell Biochem* 285: 133-142.
- Sasaki K, Yoshizaki F 2002. Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of Citrus fruit. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25: 806-808.
- Seetharam GB, Saville BA 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research* 37: 436-440.
- Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef VS, Adir N, Fishman A 2011. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J Mol Biol* 405: 227-237.
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2837-2853.
- Shaheen F, Ahmad M, Khan MTH, Jalil S, Ejaz A, Sultankhodjaev MN, Arfan M, Choudhary MI, Atta ur R 2005. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. *Phytochemistry* 66: 935-940.
- Sheldon RA, Van Pelt S 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews* 42: 6223-6235.

- Si Y-X, Ji S, Wang W, Fang N-Y, Jin Q-X, Park Y-D, Qian G-Y, Lee J, Han H-Y, Yin S-J 2013. Effects of boldine on tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation. *Process Biochemistry* 48: 152-161.
- Sima VH, Patris S, Aydogmus Z, Sarakbi A, Sandulescu R, Kauffmann JM 2011. Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents. *Talanta* 83: 980-987.
- Simsek S, Yemenicioglu A 2007. Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry* 42: 943-950.
- Slamon DJ, Romond EH, Perez EA 2006. Advances in adjuvant therapy for breast cancer. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 4: suppl 1, 4-9; discussion suppl 10; quiz 12 p following suppl 10.
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev* 96: 2563-2606.
- Stark MB, Holmberg K 1989. COVALENT Immobilization of lipase in organic-solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 942-950.
- Sticha KR, Sieg CA, Bergstrom CP, Hanna PE, Wagner CR 1997. Overexpression and large-scale purification of recombinant hamster polymorphic arylamine N-acetyltransferase as a dihydrofolate reductase fusion protein. *Protein Expr Purif* 10: 141-153.
- Stone SR, Morrison JF 1984. Catalytic mechanism of the dihydrofolate reductase reaction as determined by pH studies. *Biochemistry* 23: 2753-2758.
- Takizawa T, Imai T, Onose JI, Ueda M, Tamura T, Mitsumori K, Izumi K, Hirose M 2004. Enhancement of hepatocarcinogenesis by Kojic acid in rat two-stage models after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine or N-diethylnitrosamine. *Toxicological Sciences* 81: 43-49.
- Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Nasu M, Ueda M, Imai T, Hirose M 2003. Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicological Sciences* 73: 287-293.
- Tehei M, Smith JC, Monk C, Ollivier J, Oetl M, Kurkal V, Finney JL, Daniel RM 2006. Dynamics of immobilized and native Escherichia coli dihydrofolate reductase by quasielastic neutron scattering. *Biophys J* 90: 1090-1097.
- Thongpanchang C, Taweethai S, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y, Thebtaranonth Y 2007. Immobilization of malarial (Plasmodium falciparum) dihydrofolate reductase for the selection of tight-binding inhibitors from combinatorial library. *Analytical Chemistry* 79: 5006-5012.
- Turkova J 1999. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *Journal of Chromatography B* 722: 11-31.
- Ullah F, Hussain H, Hussain J, Bukhari IA, Khan MTH, Choudhary MI, Gilani AH, Ahmad VU 2007. Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of Rhododendron collettianum. *Phytotherapy Research* 21: 1076-1081.
- Urrutia P, Mateo C, Guisan JM, Wilson L, Illanes A 2013. Immobilization of Bacillus circulans  $\beta$ -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. *Biochemical Engineering Journal* 77: 41-48.

- Vigmond SJ, Iwakura M, Mizutani F, Katsura T 1994. Site-specific immobilization of molecularly engineered dihydrofolate-reductase to gold surfaces. *Langmuir* 10: 2860-2862.
- Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ 1999. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal Biochem* 270: 207-219.
- Voet D, Voet JG 2006. *Técnicas de Purificação de Proteínas e Ácidos Nucléicos*. Porto Alegre: ArtMed.
- Volpato JP, Yachnin BJ, Blanchet J, Guerrero V, Poulin L, Fossati E, Berghuis AM, Pelletier JN 2009. Multiple Conformers in Active Site of Human Dihydrofolate Reductase F31R/Q35E Double Mutant Suggest Structural Basis for Methotrexate Resistance. *J. Biol. Chem.* 284: 20079-20089.
- Waddell WJ 1956. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *J Lab Clin Med* 48: 311-314.
- Wan X, Chai B, Liao Y, Su Y, Ye T, Shen P, Chen X 2009. Molecular and biochemical characterization of a distinct tyrosinase involved in melanin production from *Aeromonas media*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 261-269.
- Wester RC, Melendres J, Hui X, Cox R, Serranzana S, Zhai H, Quan D, Maibach HI 1998. Human in vivo and in vitro hydroquinone topical bioavailability, metabolism, and disposition. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 54: 301-317.
- Wichers HJ, Gerritsen YAM, Chapelon CGJ 1996. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* 43: 333-337.
- Wilchek M, Bayer EA 1999. Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomol. Eng.* 16: 1-4.
- Wilchek M, Bayer EA, Livnah O 2006. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunol. Lett.* 103: 27-32.
- Williams EA, Morrison JF 1992. Human dihydrofolate reductase: reduction of alternative substrates, pH effects, and inhibition by deazafolates. *Biochemistry* 31: 6801-6811.
- Yamazaki S, Itoh S 2003. Kinetic evaluation of phenolase activity of tyrosinase using simplified catalytic reaction system. *J Am Chem Soc* 125: 13034-13035.
- Yang L, Zhou Q, Wang G, Yang Y 2013. Acetylcholinesterase biosensor based on SnO<sub>2</sub> nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modified electrode for detection of pesticides. *Biosensors and Bioelectronics* 49: 25-31.
- Yang LJ, Xiong HY, Zhang XH, Wang SF 2012. A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film. *Bioelectrochemistry* 84: 44-48.
- Yao Y, Cheng X, Wang L, Wang S, Ren G 2012. Mushroom tyrosinase inhibitors from mung bean (*Vigna radiata* L.) extracts. *International journal of food sciences and nutrition* 63: 358-361.
- Yemenicioglu A, Ozkan M, Cemeroglu B 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. *Journal of Food Science* 62: 508-510.
- Zhang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, Wei D 2007. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22: 91-98.

- Zhang DH, Lv YQ, Zhi GY, Yuwen LX 2011. Kinetic biosynthesis of l-ascorbyl acetate by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase (Lipozyme TLIM). *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34: 1163-1168.
- Zhang X, Hu X, Hou A, Wang H 2009. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 32: 86-90.
- Zhang Z, He F, Zhuo R 2013. Immobilized lipase on porous silica particles: Preparation and application for biodegradable polymer syntheses in ionic liquid at higher temperature. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 94: 129-135.